



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Toxicología

**Evaluación de residuos del pesticida clorpirifos en
semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) por
cromatografía gaseosa**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Toxicólogo

AUTOR

Diego Alejandro CHIRINOS PAJUELO

ASESOR

Lic. Fredy Enrique QUISPE JACOBO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Chirinos D. Evaluación de residuos del pesticida clorpirifos en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) por cromatografía gaseosa [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Toxicología; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Evaluación de residuos del pesticida clorpirifos en semillas de quinua (<i>Chenopodium quinoa</i> W.) por cromatografía gaseosa.
Área de investigación (*)	Ciencias Químicas
Líneas de Investigación (*)	CALIDAD E INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Distrito de La Molina, en la Región Lima
Institución que financia si corresponde	Instituto Nacional de Innovación Agraria / Programa Nacional de Innovación Agraria
Año o rango de años que abarcó	2018 – 2019
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Chirinos Pajuelo, Diego Alejandro
Número de matrícula	10040045
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
DATOS DEL ASESOR	
Apellidos y nombres	Quispe Jacobo, Fredy Enrique
Código docente: 0A0342 Categoría: AUXILIAR Clase: TIEMPO PARCIAL 20 HORAS	
Máximo grado alcanzado	LICENCIADO
Código ORCID (obligatorio)	orcid.org/0000-0002-5446-2468
Título profesional	LICENCIADO EN QUÍMICA
Departamento Académico al que pertenece	QUÍMICA BÁSICA Y APLICADA
Instituto de Investigación al que pertenece	CENTRO LATINOAMERICANO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN BACTERIOLOGÍA ALIMENTARIA-CLEIBA
Grupo de investigación al que pertenece indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	FARMACOGNOSIA Y MEDICINA TRADICIONAL / CIENCIA E INOCUIDAD ALIMENTARIA

(*) Según documentos oficiales de la Facultad



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Evaluación de residuos del pesticida clorpirifos en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) por cromatografía gaseosa

Que presenta el Bachiller en Toxicología:

DIEGO ALEJANDRO CHIRINOS PAJUELO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

Dieciocho (18) Sobresaliente

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Toxicología y Título Profesional de Toxicólogo (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 25 de noviembre de 2019


Mg. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez
Presidente


Dra. Delia Yolanda Whu Whu
Miembro


Dr. José Antonio Llahuilla Quea
Miembro


Mg. Luz Fabiola Guadalupe Sifuentes De Posadas
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



DEDICATORIA

A mi familia por su infinito amor y apoyo durante toda mi vida y enseñarme a luchar siempre por todo lo que quiero. A ellos, gracias.

A todas las personas que me apoyaron desde la aparición del primer pico cromatográfico hasta la redacción del presente documento.

AGRADECIMIENTOS

- A **Dios** por haberme dado la fuerza y sabiduría en todo momento para concluir el presente trabajo de investigación.
- Al laboratorio de Investigación Nutricional y Funcional de los Recursos Genéticos del **Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)**.
- A mi asesor **Fredy E. Quispe Jacobo** por su conocimiento, comprensión, tiempo, consejos y sobre todo por su paciencia en el transcurso del trabajo de investigación.
- Agradecer al proyecto “Caracterización pos-cosecha de quinuas comerciales del INIA en condiciones productivas de la región Lima para promover su consumo en el mercado nacional e internacional” del **Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA)** por el financiamiento y apoyo para realizar la tesis.
- A los docentes miembros del jurado: **Q.F. Tox. Jesús Víctor Lizano Gutiérrez, Mg. Luz Fabiola Guadalupe, Dra. Delia Yolanda Whu Whu y Dr. José Antonio LLahuilla Quea**, por su apoyo en la revisión, asesoría y evaluación del trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

EFS	Extracción en fase sólida
AchEasa	Acetilcolinesterasa
CALC.	Calculado
ECD	Detector Captura de Electrones
EPA	Agencia Protección Ambiental
EPP	Equipo de protección personal
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FID	Detector de ionización a la Flama
FPD	Detector Fotométrico a la Flama
GC	Cromatografía de gases
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LMR	Límite máximo de residualidad
MINSA	Ministerio de Salud
MS	Espectrometría de masas
N.D	No detectado
NPD	Detector de nitrógeno y fósforo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de la Naciones Unidas
OPs	Plaguicidas organofosforados
PLOT	Placa adsorbente y porosa
PPB	Partes por billón
PPM	Partes por millón
Quechers	Rápido, fácil, económico, eficaz, sólido y seguro
SCOT	Revestimiento de soporte
TCD	Detector de conductividad térmica
WCOT	Muros cubiertos

RESUMEN

El trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Investigación Nutricional y Funcional de los Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), entidad perteneciente al Ministerio de Agricultura, en el período comprendido entre setiembre del 2017 a mayo 2018. El objetivo general fue: Evaluar los residuos del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) en el período de cosecha, producidos en el distrito de La Molina de la región Lima. Los objetivos específicos fueron los siguientes: 1) Determinar la concentración del plaguicida clorpirifos en mg/kg (ppm) en las muestras de semillas de quinua y 2) Verificar si la concentración del plaguicida clorpirifos en las semillas de quinua se encuentra dentro del Límite Máximo Permisible según normativa de la Unión Europea y del Perú. Se evaluaron 12 muestras de quinua de un campo del distrito de La Molina y 1 muestra de quinua orgánica (libre de plaguicida) proveniente de la provincia de Yauyos, la cual ayudó para la validación del método analítico. La validación del método cumplió con los criterios establecidos por la Comisión Europea. Los análisis de las 12 muestras de quinua provenientes del distrito de La Molina presentaron residuos del plaguicida clorpirifos, 11 muestras no sobrepasan el LMR (0.05 mg/kg) establecido por las legislaciones de Canadá, Unión Europea y nuestro país, solo 1 muestra sobrepasó dicho LMR, con una concentración de 0.136 mg/kg. Los resultados muestran la exposición del plaguicida clorpirifos en semillas quinua, por ende, su presencia en nuestra dieta diaria y en la exportación.

Palabras claves: Clorpirifos, Límite máximo residual, extracción en fase sólida, cromatografía de gases, detector de captura de electrones.

ABSTRACT

The research work was done at the laboratory of Nutritional and Functional Research of Genetic Resources from the National Institute of Agricultural Innovation (NIAI), entity belonging to the Ministry of Agriculture, in the period between September 2017 and May 2018. The overall objective was: Evaluate the chlorpyrifos pesticide residues in quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* W.) produced in La Molina district of Lima region, in the harvest period. The specific objectives were the following: 1) determine the concentration of the chlorpyrifos pesticide in mg/kg (ppm) in the samples of quinoa seeds and 2) Check if the concentration of chlorpyrifos pesticide in quinoa seeds is within the Maximum Allowable Limit according to the European Union and Peruvian regulations. 12 quinoa samples from a field of La Molina district and 1 sample of organic quinoa (pesticides free) from Yauyos province were evaluated, which helped for the validation of the analytical method. The method validation met the criteria established by the European Commission. The analysis of the 12 quinoa samples from La Molina district presented chlorpyrifos pesticide residues, 11 samples do not exceed the MAL (0.05mg/kg) established the Canadian, European Union and Peruvian regulations, only 1 sample exceeded such MAL with a concentration of 0.136 mg/kg. The results show quinoa seeds exposure to chlorpyrifos pesticide, thus its presence in our diet and export.

Key words: chlorpyrifos, Maximum Allowable Limit, solid phase extraction, gas chromatography and electron capture detector.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. HIPÓTESIS	5
1.1.1. OBJETIVO GENERAL	5
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes	6
2.2. Quinoa	12
2.2.1. Composición nutricional	13
2.2.2. Producción y consumo nacional y extranjero	14
2.3. Plaguicidas	19
2.3.1. Definición y Clasificación	19
2.3.2. Plaguicidas Organofosforados	21
2.4. Clorpirifos	23
2.4.2. Toxicocinética	25
2.4.3. Toxicodinamia	27
2.4.4. Sintomatología y Tratamiento	28
2.4.5. Degradación en el medio ambiente	30
2.4.6. Legislación, Límite Máximo de Residualidad para el plaguicida clorpirifos en quinoa	32
2.5. Análisis de residuos de plaguicidas	36
2.5.1. Métodos de extracción	37
2.6. Cromatografía de gases	44

2.6.1. Partes de un cromatógrafo de gases	45
2.6.2. Detector de Captura de electrones (ECD)	53
2.7. Validación de métodos analíticos	54
2.7.1. Exactitud	55
2.7.2. Linealidad	55
2.7.3. Precisión	55
2.7.4. Límite de Detección	56
2.7.5. Límite de cuantificación	56
2.7.6. Selectividad	56
III. METODOLOGÍA	58
3.2. Materiales	59
3.4. Parte experimental	61
3.4.1. Tratamiento de la muestra	61
3.4.2. Preparación de curva de calibrado	61
3.4.3. Extracción, limpieza del extracto y su posterior análisis por GC-ECD	62
3.4.4. Análisis de las muestras mediante el equipo cromatografía de gases	65
IV. RESULTADOS	69
V. DISCUSIÓN	83
VI. CONCLUSIONES	89
VII. RECOMENDACIONES	90
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
IX. ANEXOS	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Contenido nutricional de quinua.	14
Tabla N°2. Contenido de minerales en quinua.	14
Tabla N°3. Comportamiento de la producción de quinua en Perú en toneladas (2008-2016).	16
Tabla N°4. Clasificación de plaguicidas según grupo químico.	20
Tabla N°5. Propiedades fisicoquímicas del clorpirifos.	24
Tabla N°6. Lista de plaguicidas permitidos en la producción de la quinua.	33
Tabla N°7. Límite máximo de residuos de plaguicidas para el cultivo de quinua en el Perú.	34
Tabla N°8. Adsorbentes más utilizados en SPE.	40
Tabla N°9. Condiciones del equipo GC, para la determinación de clorpirifos por GC-ECD.	64
Tabla N°10. Rampa de temperatura.	65
Tabla N°11. Resultados de análisis de muestras de quinua reales – PromPerú.	69
Tabla N°12. Áreas cromatográficas de la curva de calibración del clorpirifos.	74
Tabla N°13. Resultados del t de student para la prueba de linealidad.	75
Tabla N°14. Resultados de la evaluación del parámetro de la exactitud.	76
Tabla N°15. Resultados de la evaluación del parámetro de la precisión.	78
Tabla N°16. Resultados de análisis estadístico de la precisión.	79
Tabla N°17. Resultados de la evaluación de los límites de cuantificación y detección.	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1. Top productos más exportados en el Perú 2016 - PromPerú	1
Figura N°2. Principales motivos de rechazos de alimentos del 2016- PromPerú	3
Figura N°3. Principales alimentos rechazados en el 2016- PromPerú	3
Figura N°4. Producción nacional de quinua – Ministerio Agricultura (2017)	15
Figura N°5. Exportación de Quinua en toneladas (2008 – 2016) (Minagri)	18
Figura N°6. Fórmula general de los plaguicidas organofosforados	21
Figura N°7. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados	22
Figura N°8. Estructura química del clorpirifos	23
Figura N°9. Estructuras químicas del clorpirifos (a) y su metabolito, el Clorpirifos Oxon (b)	25
Figura N°10. Mecanismo de acción de los OPs	26
Figura N°11. Fases de la extracción en fase sólida (SPE)	42
Figura N°12. Partes básicas de un equipo de cromatografía gaseosa.	45
Figura N°13. Puerto de inyección.	46
Figura N°14. Columna de relleno.	48
Figura N°15. Columna capilar (TG-5MS, Thermo Scientific)	49
Figura N°16. Detector de captura de electrones (Thermo Scientific)	53
Figura N°17. Ubicación de la procedencia de las semillas de quinua en el distrito de La Molina- Lima. Perú.	57
Figura N°18. Método de extracción, clean-up e identificación por GC-ECD del plaguicida organofosforado clorpirifos en semillas de quinua.	63

Figura N°19. Análisis del plaguicida clorpirifos según legislación Minsa y Europa.	70
Figura N°20. Análisis del plaguicida clorpirifos según legislación de Canadá	70
Figura N°21. Análisis del plaguicida clorpirifos según EE.UU	71
Figura N°22. Identificación del analito clorpirifos por GC-ECD.	72
Figura N°23. Selectividad del plaguicida clorpirifos. (Blanco: color azul, fortificado: color negro).	73
Figura N°24. Curva de calibración del estándar de plaguicida Clorpirifos.	74
Figura N°25. Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud día 1	80
Figura N°26. Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud día 2	80

I. INTRODUCCIÓN

La quinua se considera (es considerada) como uno de los alimentos más completos de la variedad de semillas andinas a nivel nacional e internacional. La importancia que adquiere el cultivo se basa en la facilidad con que este se adapta a diferentes tipos de suelos, produciendo semillas con un balance de aminoácidos, proteínas, minerales y bioactivos que el ser humano requiere para su alimentación.⁽¹⁾

Desde el 2016, tal y como se presenta en la Figura N°1, la quinua es uno de los alimentos que más se exporta en el Perú.

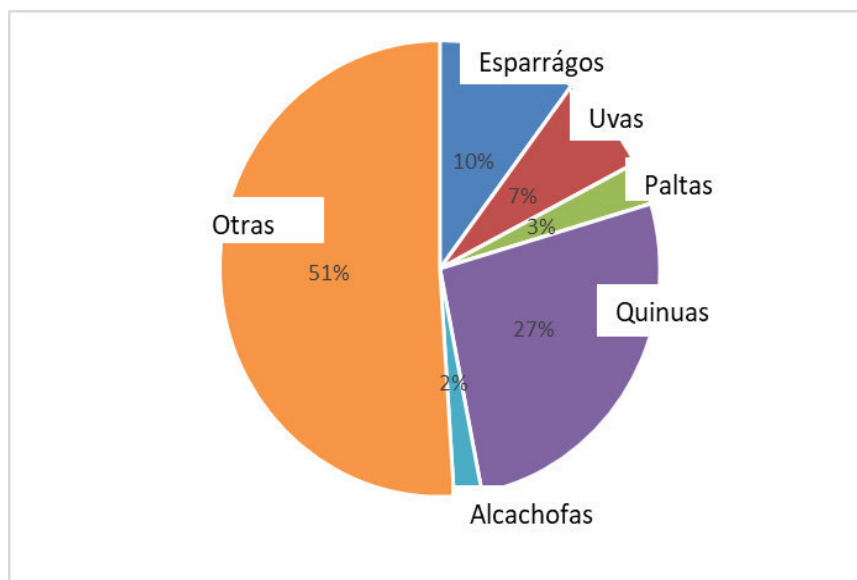


Figura N°1. Top productos más exportados en el Perú 2016 - PromPerú.⁽²⁾

Debido a la gran acogida nacional e internacional de la quinua y los ingresos económicos que se perciben por su cultivo, los agricultores incrementaron sus áreas de producción y como parte de su manejo cultural, aplicaron mayor cantidad

de plaguicidas para controlar plagas y enfermedades que atacan al cultivo durante su crecimiento. Haciendo el empleo de los plaguicidas una práctica habitual. Esto, trae como consecuencia que las semillas de quinua se encuentran expuestas a sustancias tóxicas, y las aplicaciones indiscriminadas producen residuos tóxicos con impactos en la salud y el ecosistema. Debido a dichas aplicaciones, los países a través de los organismos nacionales e internacionales establecen límites máximos de residuos (LMR) debido a su toxicidad en el ser humano y en el medio ambiente, convirtiéndose los LMRs en una herramienta para la comercialización de la quinua en mercados nacionales e internacionales.⁽²⁾

Según PROMPERÚ, el año 2016 se registraron devoluciones de alimentos de parte de los Estados Unidos y se reportó que el 34 % de los motivos de rechazo fue por la presencia de residuos de plaguicidas, tal y como se presenta en las Figuras N° 2 y 3. Dentro de este grupo de productos, se encontró la quinua. Además, PROMPERÚ informó que en el año 2017 las devoluciones de la quinua se debieron en un 30 % a la presencia de plaguicidas, lo cual demuestra lo crucial que es realizar investigaciones para conocer la residualidad de plaguicidas en cultivos de importancia económica que se exportan a los Estados Unidos y otros países del mundo.⁽²⁾

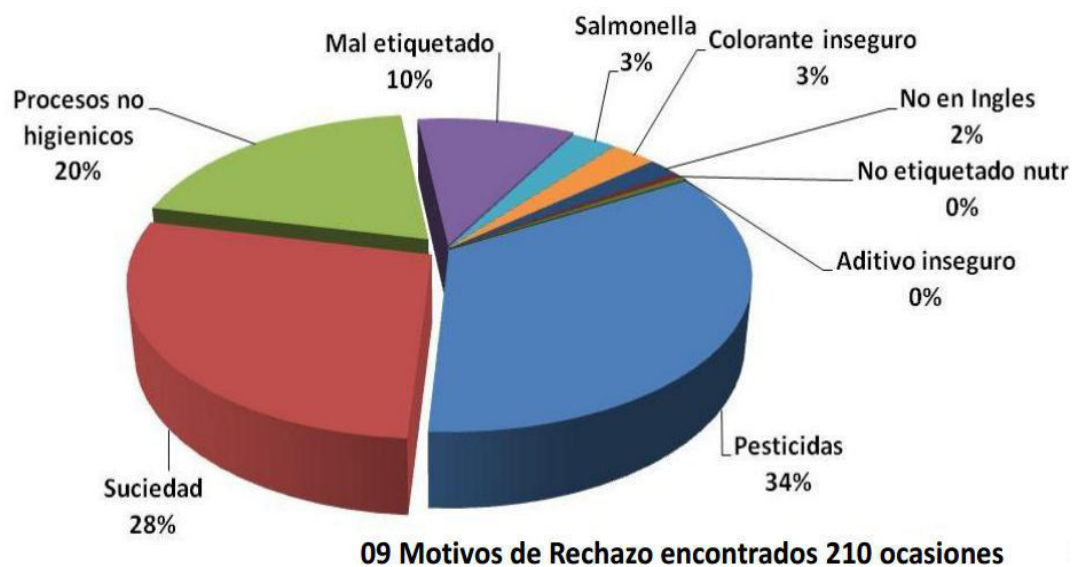


Figura N°2. Principales motivos de rechazos de alimentos del 2016- PromPerú
(2)

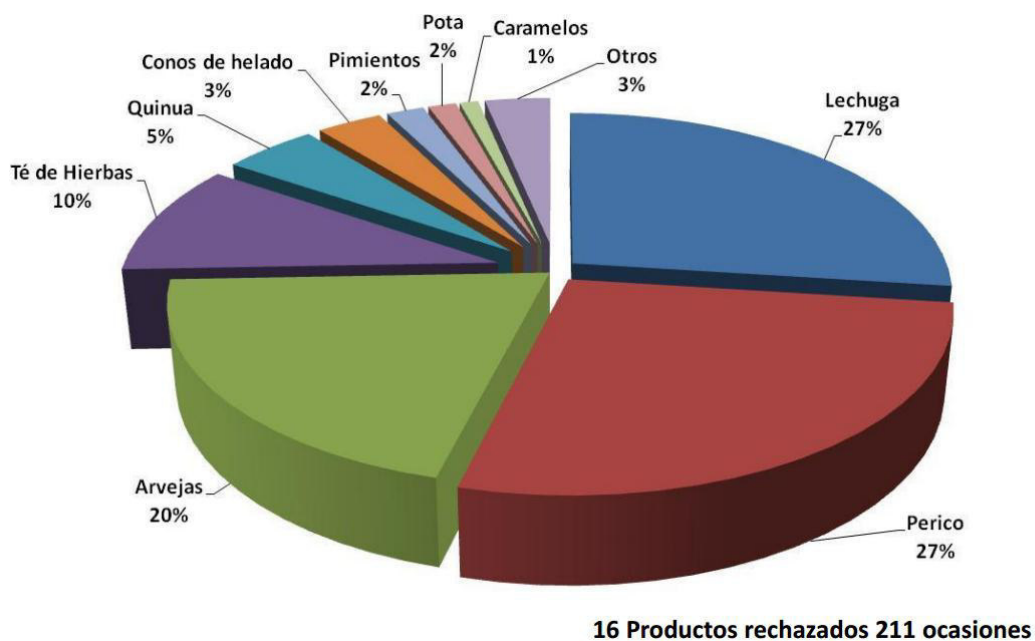


Figura N°3. Principales alimentos rechazados en el 2016- PromPerú.⁽²⁾

Por ello, para el análisis de residuos de plaguicidas en productos de cosecha como la quinua, se necesita de metodologías selectivas y altamente sensibles que faciliten el análisis, y asegurar alimentos libres de contaminantes. Entre las técnicas de extracción de plaguicidas se encuentra el método de extracción SPE (fase sólida) que junto con la técnica de cromatografía de gases acoplada con detector captura de electrones (GC-ECD), se convierten en una de las técnicas analíticas recomendadas para la determinación de una gran cantidad de plaguicidas con resultados satisfactorios en cuanto a precisión, exactitud y sensibilidad.⁽³⁾

Bajo estas consideraciones, se realizó el estudio con la finalidad de estudiar la aplicación de técnicas de extracción en fase sólida para el plaguicida clorpirifos en muestras de semillas de quinua y su cuantificación por cromatografía de gases acoplada a un detector de captura de electrones (GC-ECD).

1.1. HIPÓTESIS

Las semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) presentan concentraciones de residuos del plaguicida clorpirifos que no exceden los Límites Máximos Permisibles según la normativa de la Unión Europea y del Perú.

1.1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los residuos del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua (*Chenopodium quinoa* W.) en el período de cosecha, producidos en el distrito de La Molina de la región Lima.

1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración del plaguicida clorpirifos en mg/kg (ppm) en las muestras de semillas de quinua.
- Verificar si la concentración del plaguicida clorpirifos en las semillas de quinua se encuentra dentro del Límite Máximo Permisible según normativa de la Unión Europea y del Perú.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Los daños generados a la salud de los agricultores y al medio ambiente debido al uso indiscriminado de plaguicidas han aumentado en los últimos años. El uso intensivo y generalizado de estos productos ha creado varios problemas relacionados con la salud pública, desequilibrio del medioambiente y el comercio de alimentos. La quinua es una semilla andina de alto valor nutritivo, de suma importancia en la dieta de las personas, en la actualidad viene siendo exportado a mercados internacionales, este cultivo requiere la aplicación de plaguicidas para llegar a una producción satisfactoria lo que llevaría a presentar problemas de residualidad de dichos plaguicidas en la quinua, lo que afectaría severamente su exportación y la salud de las personas que lo consumen. Viendo la situación de esta problemática, el presente trabajo tiene como objeto de estudio, determinar los niveles de residuos del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua en el período de cosecha. Por ello a continuación se detallará algunos trabajos de investigaciones dedicados al análisis de plaguicidas en alimentos.

Los plaguicidas cumplen un rol fundamental en la industria agrícola, en el control de plagas y enfermedades. Se trata de sustancias, generalmente de origen sintético, con múltiples propiedades físicas y químicas. Sin embargo, existe cada vez más agroquímicos de origen biológico (por ejemplo, tenemos a los extraídos de los propios vegetales), cuya toxicidad es más limitada, la mayor cantidad de plaguicidas utilizados en estos días suelen tener un efecto tóxico en la salud de las personas, animales o al medio ambiente, debido a que están diseñados para

erradicar o interferir de forma negativa a los receptores biológicos, que son su sitio de acción. No obstante, si son utilizados en condiciones óptimas de trabajo, dichos agroquímicos son de gran utilidad para el control de múltiples plagas, enfermedades (causadas por hongos) y el crecimiento de malezas (EPA, 2014). Del mismo modo, pertenecen al grupo de los plaguicidas, productos reguladores del crecimiento, exfoliantes, desecantes, y otras sustancias utilizadas en los campos, previa o posterior a la cosecha para salvaguardar la producción, movilidad y almacenamiento.⁽⁴⁾

La venta mundial de plaguicidas, según datos del 2013, fue de aproximadamente 60.689 billones de dólares, siendo los más vendidos los insecticidas, herbicidas y fungicidas (Statista, 2015). En el 2017 la industria agroquímica aumentó sus ganancias en un 5 % siendo los países de mayor demanda en dichos productos, los de América del sur (Brasil, Argentina, Colombia, Perú, entre otros) y Asia.⁽⁴⁾

El uso de esta gran variedad de plaguicidas genera problemas de residualidad en alimentos, debido a esto entidades como Unión Europea y Codex Alimentarius establecen sus respectivos límites máximos de residualidad (LMRs). Dichos parámetros son tomados por diferentes países alrededor del mundo. Para vigilar el cumplimiento de los LMRs, es crucial solicitar periódicamente ensayos de alimentos que se destinan al consumo de las personas. Dichos ensayos son llevados a cabo por instituciones para el monitoreo de residuos de contaminantes, el cual debe contar equipamiento sofisticado como es la cromatografía/espectrometría de masas (MS), debido a su alta especificidad y

sensibilidad. La cromatografía líquida o gaseosa acoplada a la espectrometría de masas, es hoy en día la técnica confirmatoria con analizadores cuadrupolares, para diferentes tipos de analitos. Todo esto es acompañado con un adecuado proceso de extracción. Existen diferentes métodos de extracción, comúnmente se utiliza la extracción por solventes, fase sólida (SPE), micro extracción en fase sólida. Los últimos años, se ha extendido en el análisis de contaminantes, el método de extracción conocido como QuEChERS, el cual según sus siglas en inglés significa, sencillo, efectivo, robusto y seguro.⁽⁴⁾

Así, por ejemplo, el trabajo realizado por Strada J. (2014) llamado “Evaluación del nivel de residuos de plaguicidas en granos de cereales y oleaginosas aplicados en el campo y en almacenamiento en la región central de Argentina” desarrolló y validó la metodología de extracción utilizando QuEChERS y su posterior identificación y cuantificación por GC-MS donde obtuvo porcentajes de recuperación mayores al 70 % y una desviación estándar relativa menor al 20 %. Respecto a los análisis en muestras reales se evidencia la presencia de plaguicidas endosulfán, clorpirifos, diclorvos, entre otros.⁽⁵⁾

Páez M, Martínez J. (2013) en su trabajo de investigación “Implementación de la metodología QuEChERS en el análisis de residuos de plaguicidas en maíz blanco (*Zea mays*) ” desarrolló una metodología de extracción por QuEChERS y su posterior identificación y cuantificación por GC-ECD, los resultados de la validación de la metodología fueron satisfactorios, obteniéndose porcentajes de

recuperación comprendidos entre 71.4 -111.6 % con RSD por debajo del 9.2 % y un rango lineal de $r^2 > 0.9892$.⁽⁶⁾

En el caso de granos y acorde con el presente trabajo de investigación en quinua, se realizaron los siguientes trabajos:

Así tenemos el trabajo Zirena (2010) en su estudio sobre “Evaluación del método QuEChERS para la cuantificación de agrotóxicos en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.)”. El objetivo de la investigación fue la identificación y cuantificación de 18 plaguicidas en 24 muestras de quinua “orgánica” provenientes del departamento de Puno, utilizando la técnica de extracción conocida como QuEChERS y su posterior identificación y cuantificación por cromatografía líquida con detector masa/masa. Los resultados obtenidos demostraron que todas las muestras presentaban concentraciones de diferentes plaguicidas (insecticidas y fungicidas) todas ellas incumplen los requisitos de los Estados Unidos que prohíbe el ingreso de quinua con la presencia de plaguicidas no registrados a cualquier concentración. Sin embargo, para destinos como Canadá y la Unión Europa no sobrepasan sus límites máximos permitidos (100 y 50 ppb respectivamente).⁽⁷⁾

Ortega *et al.*, (2016) realizó el trabajo de investigación sobre la “*determinación de plaguicidas organoclorados en granos de quinua orgánica (Chenopodium quinoa Willd.) por GC- μ ECD utilizando el método QuEChERS*”. En dicha investigación, 12 plaguicidas organoclorados fueron analizados en quinua orgánica (libres de plaguicidas), recolectadas en Puno-Perú, la metodología de extracción QuEChERS fue utilizada para extraer los analitos de interés y la identificación y

cuantificación mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de captura electrónica (GC- μ ECD). El método se validó mediante una muestra de quinua orgánica, la cual se utilizó como muestra blanco, se realizó el fortificado a las concentraciones de 0.01 y 0.1 mg/kg; los porcentajes de recuperación comprendidos entre 73.66 a 128.09 % , y un RSD \leq 16 %; la metodología resultó ser lineal, con un $r^2 \geq 0.99$ y los límites de cuantificación (LQ) entre 0.001 a 0.01 mg/kg, además se demostró que la muestra de quinua no ejerce efecto matriz y finalmente se reportó la persistencia de plaguicidas organoclorados (p,p'-DD, p,p'-DDE y mirex) en 5 muestras, de ellas 2 contenían residuos de p,p'-DDE a concentraciones superiores a 0.01 mg/kg. Los resultados evidenciaron la facilidad de la quinua para poder acumular contaminantes y revelan que existe la necesidad de exigir nuevas formas para garantizar la inocuidad de los alimentos .⁽⁸⁾

Del mismo modo, nuestro país realizó un estudio de determinación de plaguicidas en quinua. La institución responsable de llevar el estudio a cabo fue el Servicio Nacional de Sanidad Agraria en el 2014. La DIAI realizó el informe sobre el monitoreo de residuos de agroquímicos y otros contaminantes en el cultivo de la quinua (*Chenopodium quinoa* W.) donde se presentan los resultados obtenidos del monitoreo de residuos químicos de plaguicidas, metales pesados, micotoxinas y contaminantes biológicos realizados en quinua (*Chenopodium quinoa* W.), como alimento de origen vegetal de procesamiento primario, en las regiones de Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cusco, Huancavelica, Junín, Lambayeque, La Libertad, Piura y Puno; zonas de mayor área sembrada de quinua a nivel nacional en los últimos años. Donde se reportaron los siguientes resultados, de 50 muestras

de quinua, se observa la residualidad de 18 plaguicidas en los análisis de las 50 muestras de quinua. De las 10 regiones monitoreadas, se reportaron 13 residuos de plaguicidas que excedieron los límites máximos establecidos por la DG/SANCO/UE; siendo el Dimetomorfo el que se registró en 6 muestras excediendo el LMR = 0.01 mg/kg; seguido por el Imidacloprid, presente en 4 muestras excediendo el LMR = 0.1 mg/kg y con 2 muestras el Tebuconazol con residuos mayores al LMR = 0.02 mg/kg establecido por la DG/SANCO/UE para granos de quinua. Por otro lado, se registraron residuos de plaguicidas sin LMR establecidos por la DG/SANCO/UE para Dicrotofós (La Libertad), Fentoato (Piura) y Benalaxil (Arequipa). Asimismo, se reportaron muestras con residuos de plaguicidas que no excedieron los LMR de la DG/SANCO/UE para clorpirifos en 6 muestras en Apurímac, La Libertad y Arequipa; Imidacloprid en 2 muestras en La Libertad y con 1 muestra de Piraclostrobin en La Libertad, Lufenuron y Azoxistrobin en Lambayeque; Atrazina y Pirimifos-metil para Piura. Finalmente, de los 18 plaguicidas químicos reportados en las 50 muestras de quinua de las 10 regiones monitoreadas, el Dimetomorfo, es el único plaguicida con registro autorizado por el SENASA para el cultivo de la quinua, como Autoridad Nacional del Registro de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola; para el control del “mildiu”, cuyo agente causal es el hongo *Peronospora farinosa*. Sin embargo, es un plaguicida químico que no tiene LMR en el *Codex Alimentarius*, en EPA/USA; pero si tiene LMR establecido por la DG/SANCO/UE (0.01 mg/kg) .⁽⁹⁾

2.2. Quinua

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd), es una planta herbácea anual, de gran dispersión a nivel mundial, contiene características singulares en su estructura, presentación y comportamiento en diferentes zonas donde se cultiva, siglos atrás fue utilizada para la alimentación, se estima, que la domesticación de dicha planta ocurrió hace más de 7000 años a.C., presenta una gran variación y plasticidad para adaptarse a diferentes climas, es cultivada desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m., además puede ser cultivada en zonas áridas, entre otros climas variados; también es altamente tolerable a la falta de agua, altas temperaturas, niveles altos de sal en suelos, entre otros, los cuales afectan negativamente al cultivo sembrado .⁽¹⁰⁾

La sierra contiene a uno de los 8 mayores centros de cultivos de plantas del mundo, lo cual da origen a uno de los sistemas agronómicos más rentables y con gran diversificación en el mundo entero.

Se evidencian mayores variedades del cultivo de la quinua en las zonas alto andinas del Perú (Sicuni-Cusco) y Bolivia (Potosí). Se cuentan con escasa información histórica sobre el cultivo de la quinua. Empero, existen pruebas fidedignas de parientes del cultivo de la quinua que demuestran que su domesticación lleva ya una gran cantidad de años, hasta llegar a la planta domesticada y cultivada a partir de la silvestre, procedimiento que posiblemente se empezó como un cultivo usado únicamente por sus hojas en la alimentación y luego por las semillas. En la actualidad, las especies y parientes silvestres se utilizan comúnmente como jataco o llipcha (verdura de hoja) en varias

comunidades del sector andino. Seguidamente, la planta fue adaptada a otras condiciones climáticas, edáficas y culturales, convirtiendo a dicha especie en una adaptada, desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m y sus beneficios en los pobladores según sus requerimientos alimenticios.⁽¹⁰⁾

2.2.1. Composición nutricional

La quinua es una planta nativa alimenticia de alto valor nutritivo, utilizada como alimento por los incas y culturas anteriores. La quinua sirve como un sustituto de proteínas de la región. La importancia de estas proteínas se basa en su calidad; con una composición equilibrada de aminoácidos esenciales, casi igual a la composición de la caseína, la cual se encuentra en la leche. En algunas ciudades del mundo, se necesita incluir proteínas de muy buena calidad a sus dietas, lo que lleva a un problema, para ser más específicos en dichas ciudades, al no encontrar proteínas de origen animal, las obtienen a partir de cereales, leguminosas entre otros. A pesar de que el aporte energético de estos alimentos es óptimo, son insuficientes en aminoácidos esenciales, lo que llevaría a cuadros de desnutrición, debido a esto la quinua resulta ser una solución para dicho problema.⁽¹¹⁾

Según Jubete (2009) ⁽¹⁾ los resultados para la determinación de macronutrientes de quinua se presentan en la Tabla N°1.

Tabla N°1. Contenido nutricional de quinua.⁽¹⁾

Semilla	Proteínas	Grasas	Almidón total	Fibra Dietética	Ceniza
Quinua	14.5 ± 0.3	5.2 ± 0.1	64.2 ± 1.3	14.2 ± 0.6	2.7 ± 0.0

Datos representados en porcentaje de peso seco básico ± desviación estándar. Los factores para la conversión de nitrógeno para proteína son 5.85 para la quinua.

En un trabajo de investigación elaborado por Jubete (2009) ⁽¹⁾, demostró la cantidad de minerales de la quinua tal y como se presenta a continuación:

Tabla N°2. Contenido de minerales en quinua .⁽¹⁾

Semilla	Calcio	Magnesio	Zinc	Hierro
Quinua	32.9 ± 3.3	206.8 ± 6.4	1.8 ± 0.0	5.5 ± 0.5

2.2.2. Producción y consumo nacional y extranjero

La quinua se cultiva hace cientos de años en nuestro país. No obstante, en 1990 su producción disminuyó aproximadamente hasta 20 mil toneladas, pero a inicios de los 2000 comienza su renombre en la alimentación. Debido a un aumento de la demanda, la producción aumentó aproximadamente a las 30 mil toneladas y conjuntamente se inicia la exportación de manera “floja” debido a que la gran parte

de la producción se destinaba al mercado interno. En el 2010 la producción aumentó por más de las 40 mil toneladas, en el 2012 sobrepasó las 44.2 mil toneladas, y se logra exportar 10 mil toneladas, en la Figura N°4 se presenta la tendencia al aumento en la producción de quinua a nivel nacional y regional .⁽¹²⁾



Figura N°4. Producción nacional de quinua – Ministerio Agricultura (2017).⁽¹²⁾

De igual manera, se observa un aumento en la presión externa a causa de una mayor oferta, lo que hace que se cultive a nivel de la costa, de tal forma que para el 2013 se logra una cifra sin igual, de 52 mil toneladas. En esta ocasión, en el 2013 es llamado “Año Internacional de la Quinua”, por la ONU y la FAO, lo cual nos ayudó a enseñar al mundo que la quinua es uno de los alimentos más completos del mundo. Cerca del 2012, se evidenció que el 96 % de la producción de quinua era oriundo del sector andino, sin embargo, en el año 2013 baja hasta un 89 %, esta variación es recuperada desde la costa del Perú. Nuevamente en el 2013 se consigue alcanzar la cúspide de la presión por un aumento de abastecimiento de quinua peruana, y los precios llegan al máximo nivel en campo,

especialmente la quinua proveniente de Arequipa, la cual proviene de una producción convencional que evidencia gran demanda por comercio exterior. ⁽¹²⁾

En el 2014 la sierra desacelera su protagonismo en un 60 % (114.7 mil toneladas), sin embargo, en la región Puno, se observa una producción inimaginable de 36.2 mil toneladas. En la producción de la costa, esta colabora con el 40 % faltante, siendo Arequipa la que llega a producir aproximadamente el 71 % de la producción de esta zona, lo faltante es completado por la Libertad, Lambayeque, Lima, Tacna y Moquegua. La producción estacional esencialmente de la sierra entre los meses de abril a julio, ahora se puede observar durante todo el año. En la Tabla N°3 se presenta la producción de quinua en diferentes departamentos del Perú. ⁽¹²⁾

Tabla N°3. Comportamiento de la producción de quinua en Perú en toneladas

(2008 – 2016) – Minagri.⁽¹²⁾

Año	Nacional	Puno	Ayacucho	Junín	Cusco	Apurímac	Arequipa	La Libertad	Lambayeque
2008	29867	22691	1721	1145	1776	892	264	364	0
2009	39397	31160	1771	1454	2018	933	473	415	0
2010	41079	31951	2368	1586	1890	1212	650	430	0
2011	41182	32740	1444	1448	1796	1190	1013	354	0
2012	44213	30179	4188	1882	2231	1981	1683	505	0
2013	52130	29331	4925	3852	2818	2010	5326	1146	427
2014	114725	36158	10323	10551	3020	2690	33193	4155	3262
2015	105666	38221	14630	8518	4290	5785	22379	3187	778
2016	77652	35166	16657	3802	3937	4805	6157	2900	28

En el 2006 se presenta grandes cantidades de volúmenes de exportación, las cuales superan las 1000 toneladas; Bolivia era el estado que únicamente abastecía al gran mercado internacional con una quinua esencialmente orgánica, orientada a exclusivos destinos en el mercado. La cantidad que exporta nuestro país, se duplica en el 2008 (2.1 mil toneladas), y nuevamente se duplica en el 2010 (4.8 mil toneladas). A fines del 2011 la ONU dio a conocer en todo el mundo que el 2013 se conocerá como el “Año Internacional de la Quinua” (AIQ) y que, en el año 2012, comenzarían los preparativos, tanto en nuestro país como en países

internacionales, con el fin de dar a conocer al mundo entero sobre los grandes beneficios de la quinua andina. Los resultados eran consolidar y ampliar las exportaciones (especialmente en el mercado estadounidense). En el año 2012 se evidenció una exportación de 10.2 mil toneladas, en el 2013 los precios aumentaron de 75 % a 18.2 mil toneladas; ya para el 2014 a causa de la exigencia de los mercados internacionales, se logró exportar 36.2 mil toneladas. Ya para el 2016 fue el momento cumbre para las exportaciones de quinua, en el cual se alcanzó los mayores precios y un valor de exportación inimaginable (US\$ 196.4 millones). En la Figura N°5 se presenta el aumento de las exportaciones en dólares. ⁽¹²⁾

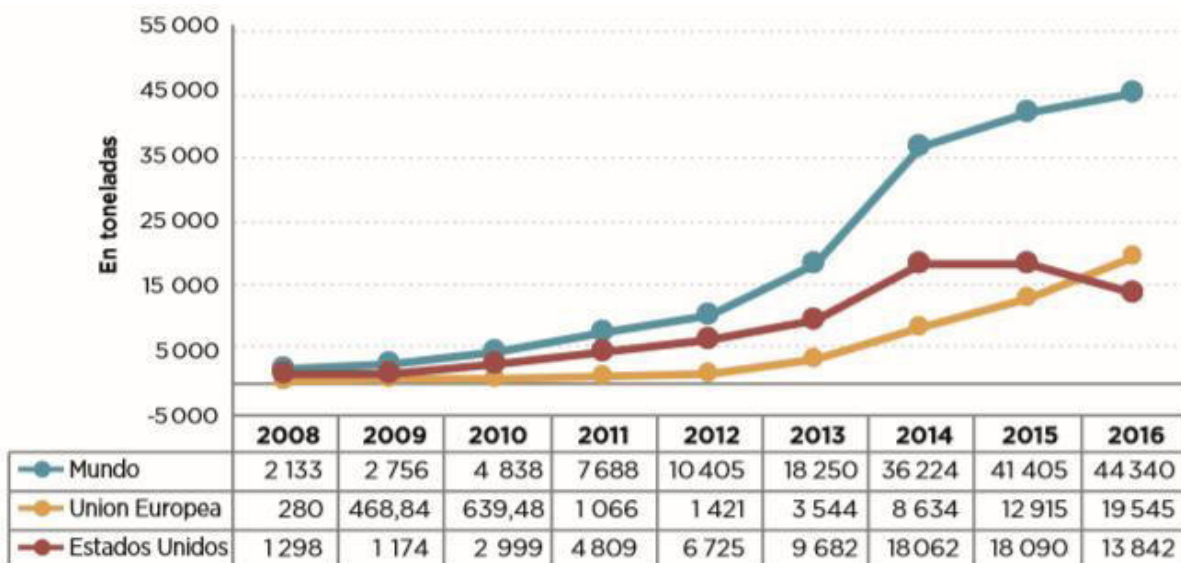


Figura N°5. Exportación de Quinua en toneladas (2008 – 2016) (Minagri).⁽¹²⁾

2.3. Plaguicidas

2.3.1. Definición y Clasificación

Según EPA los plaguicidas y/o plaguicidas son sustancias químicas o mezcla de sustancias utilizadas para la prevención, eliminación, mitigación de cualquier plaga y de igual manera aquella sustancia, que se utilizan para estimular el desarrollo del vegetal, entre otros.⁽¹³⁾

Los plaguicidas se clasifican comúnmente según la plaga que erradica, grado de toxicidad y estructura química del analito.

Los plaguicidas más aplicados en la industria agrícola, son los herbicidas (combatir cultivos no deseados), fungicidas (hongos y levaduras), insecticidas y nematocidas esto dependerá a que plaga se desea erradicar o controlar.⁽¹³⁾

- Según su toxicidad y estructura química

Según dicha función, existen múltiples clasificaciones, sin embargo, se utiliza lo dispuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual clasifica según el grado de intoxicación en la salud o múltiples exposiciones en un período de tiempo; dicha taxonomía, es basada principalmente en su DL50 a través de la piel u oral en roedores albinos. Los resultados se basan en el tratamiento estadístico de concentración de la cantidad en miligramos del plaguicida por el peso en kilogramos del animal, necesaria para eliminar a la mitad de la población de un

grupo de mamíferos. Cuando se reporte menor cantidad de DL50, existirá mayor toxicidad por parte del plaguicida.⁽¹⁴⁾

Tomando en cuenta lo anterior, las categorías de clasificación son: IA (extremadamente peligroso), IB (altamente peligroso), II (peligroso) y III (ligeramente peligroso).⁽¹⁵⁾

Según la estructura química existe una alta variedad de plaguicidas y se pueden ordenar como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, triazinas, organometálicos, entre otros.

En la Tabla N°4 se presenta información de algunos grupos de plaguicidas.⁽¹⁶⁾

Tabla N°4. Clasificación de plaguicidas según grupo químico.⁽¹⁶⁾

Plaguicida	Descripción
Organoclorados	Caracterizados por contar gran número de átomos de cloro en su estructura.
Organofosforados	Los plaguicidas organofosforados (OPs) son sustancias químicas derivadas del ácido fosfórico
Ácido carbámico	Inhibidores de la acetilcolinesterasa.
Piretroides	Son ésteres derivados de la flor del crisantemo,
Triazinas y sus derivados	Derivados heterocíclicos del nitrógeno.

2.3.2. Plaguicidas Organofosforados

Los plaguicidas organofosforados (OPs) son sustancias químicas derivadas del ácido fosfórico, y por lo general suelen ser liposolubles y semivolátiles, bajo esta denominación se encuentran una gran variedad de compuestos que son utilizados para el control de diferentes plagas, dependerá de la situación de sus radicales en la fórmula básica, los cuales dan origen a nuevos grupos de plaguicidas con gran actividad de penetración, distribución, y activación en su sitio de ataque, de igual modo en su potencia y selectividad.⁽¹⁷⁾

En la Figura N°6 se presenta la estructura general de un Plaguicida organofosforado.

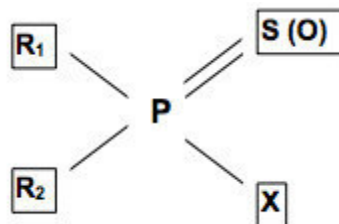


Figura N°6. Fórmula general de los plaguicidas organofosforados.⁽¹⁸⁾

La liposolubilidad de los OFs aumenta su absorción debido a que atraviesan las barreras biológicas (piel, mucosas) de igual manera logran ingresar el sistema nervioso central y en algunos casos suelen almacenarse en los tejidos provocando toxicidad retardada, su media presión de vapor les permite ser semivolátiles y poder ser absorbidos por vías respiratorias, sufren hidrólisis alcalina en el suelo y en material biológicos, generalmente no suelen ser persistente en el ambiente.⁽¹⁸⁾

Todas estas propiedades antes mencionadas están ligadas al grupo funcional que se une al fósforo por enlace doble, cuando el grupo funcional y/o átomo unido al fósforo es el oxígeno estos compuestos se denominan oxones, mientras que si es el azufre son llamados TIONES.⁽¹⁹⁾

En la Figura N°7 se muestran las diferencias entre estos 2 grupos de compuestos:

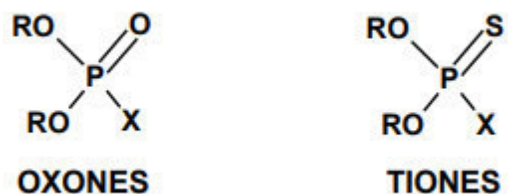


Figura N°7. Estructura química general de los plaguicidas organofosforados.⁽¹⁹⁾

En la actualidad los organofosforados son la clase de plaguicidas más utilizados alrededor de todo el mundo para el control de plagas, tanto en entornos residenciales como agrícolas.⁽²⁰⁾ También son utilizados por la industria como disolventes, plastificantes, retardantes de llama y aditivos de extrema presión (por ejemplo, lubricantes) e incluso por los militares como agentes nerviosos.⁽²¹⁾

2.4. Clorpirifos

El clorpirifos (O, O-dietil O-(3, 5,6- triclopiridin-2-ilfosforotioato) es un insecticida organofosforado utilizado como control químico en producción de alimentos en campo, además tiene la capacidad de erradicar completa y directamente a las moscas, mosquitos, cucarachas, entre otros. Estas moléculas son absorbidas por la planta, convirtiéndola en una planta venenosa para dichos insectos.⁽²⁴⁾

Su uso abarca viviendas y en la industria agrícola, es utilizado para eliminar todo tipo de insectos y múltiples plagas que se presentan en los plantíos de cultivos.⁽²⁶⁾ Es aplicado en cosechas, debido a sus propiedades físicas de adhesión en el suelo, en especial aquellos suelos que cuentan con gran presencia de materia orgánica. Una vez en el medio ambiente, es degradado por la actividad

de la luz solar, microorganismos entre otros procesos bioquímico.⁽²⁷⁾ La degradación en suelos oscila de días hasta más de 3 años; por otro lado, en plantas y cultivos la vida media se encuentra comprendida entre 1 semana a 3 meses, generalmente.⁽²⁸⁾ También este plaguicida se encuentra en diferentes tipos de agua.⁽²⁹⁾ Según estudios del científico Mackay (2001) ⁽³⁰⁾ el plaguicida clorpirifos se encuentra en suelos (49.64 %), sedimentos (46.4 %) y fuentes de agua (2.29 %); no obstante, dichos valores dependen del porcentaje de aplicación en cultivos y condiciones del medio ambiente.⁽³⁰⁾

Según el riesgo a la salud, el clorpirifos se encuentra en el grupo “*moderadamente tóxicos*”.⁽³¹⁾ Esto significa que presenta actividad en el SNC, interfiriendo con los procesos de degradación de la acetilcolina a través de la acetilcolinesterasa.⁽³²⁾ Además perjudica severamente a organismos del mar e invertebrados.⁽³³⁾ En el caso de las personas, la ingesta o inhalación, produce lesiones a nivel del sistema nervioso, digestivo y respiratorio, en algunos casos la muerte dependiendo de la cantidad absorbida y el tiempo a lo que se estuvo expuesto.⁽²⁷⁾

La estructura del plaguicida clorpirifos se detalla en la siguiente figura:

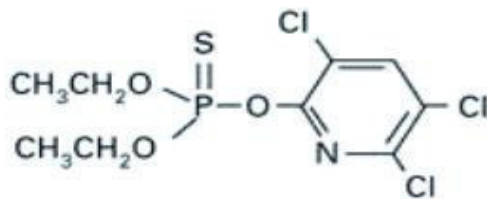


Figura N°8. Estructura química del clorpirifos.⁽²⁵⁾

2.4.1. Propiedades Fisicoquímicas

En la Tabla N°5 se observan algunas propiedades físicas y químicas más relevantes del plaguicida organofosforado clorpirifos.

Tabla N°5: Propiedades fisicoquímicas del Clorpirifos.⁽²⁵⁾

Propiedad	Descripción
Nombre IUPAC	O, O-dietil O-(3, 5,6- tricloropiridin-2-ilfosforotioato
Fórmula química	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Peso molecular	350.6 g/mol
Solubilidad en agua a 20 °C	0.39 – 1.05 mg/L
Log K _{ow} a 20 °C	4.7 – 5.11
Punto de ebullición	145 – 160 °C
Punto de fusión	42 – 43 °C

Kow: Coeficiente de reparto octanol/agua

2.4.2. Toxicocinética

El clorpirifos ingresa al cuerpo humano a través de la piel, pulmones y por la ingesta. La primera, es la vía de ingreso más común en intoxicaciones en el trabajo. Debido a sus propiedades liposolubles y a la clase de solvente utilizado para la fabricación de dicho agroquímico, además de las heridas en la piel que puede presentar el intoxicado. Todo esto facilita su ingreso a través de la piel. A

nivel de las vías respiratorias, es absorbido durante la manipulación, en la formulación del producto, mezcla, almacenamiento, o en casos de incendios, uso en campo (sin utilizar los EPPs principales) o en casos de derramamiento. En el caso de ingreso al sistema digestivo, ocurre cuando se ingiere de forma voluntaria o accidental, o por productos alimenticios que han sido expuestos a estos plaguicidas. La estabilidad del plaguicida clorpirifos y sus metabolitos, es por lo general corta (alrededor de 48 horas). Dicha biotransformación se realiza mediante la presencia de enzimas oxidasas, hidrolasas y glutatión-S-transferasas, principalmente provenientes del hígado. Su eliminación es altamente rápida y por lo general se realiza por la orina y, en poca cantidad, por las heces y aire expirado; su punto máximo de excreción es a los 2 días; luego de esto disminuye considerablemente. En la siguiente figura se presentan las estructuras del plaguicida clorpirifos y uno de sus principales metabolitos.⁽¹⁹⁾

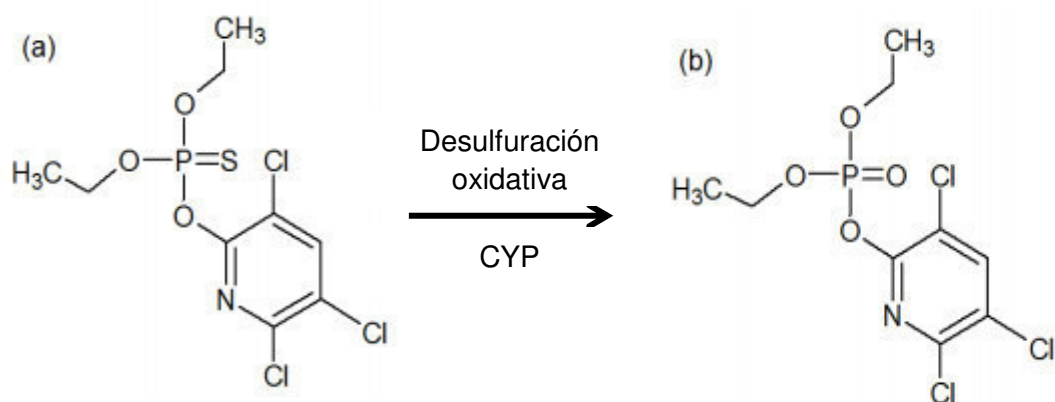


Figura N°9. Estructuras químicas del clorpirifos (a) y su metabolito, el Clorpirifos Oxon (b).⁽²⁵⁾

2.4.3. Toxicodinamia

El clorpirifos desarrolla su toxicidad mediante la fosforilación de la enzima Acetilcolinesterasa (AChEasa) en las terminaciones nerviosas; el clorpirifos se une a una parte de la enzima (generalmente en la zona esterásica) generando un enlace fuerte, si no se destruye mediante tratamiento farmacológico, se puede unir a la enzima de forma irreversible, quedando esta inhabilitada para ejercer su actividad fisiológica. La inactividad de dicha función permite la bioacumulación de la Acetilcolina (ACh) ocasionando los efectos nicotínicos y en el SNC.^(18,22,23) En la Figura N°10 se presenta el mecanismo de acción del plaguicida clorpirifos a nivel de la acetilcolinesterasa.

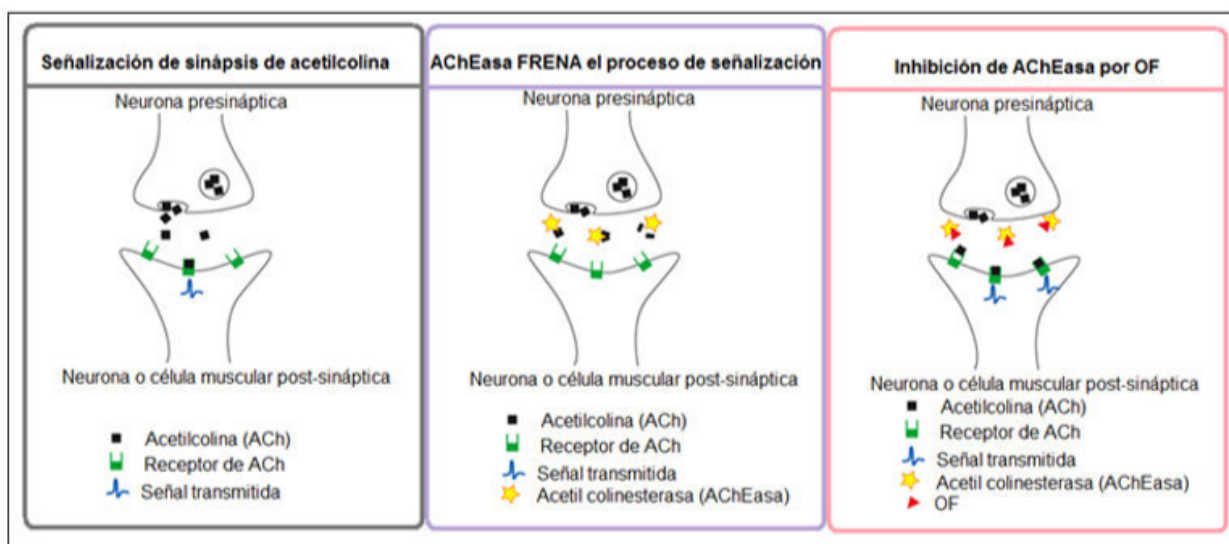


Figura N°10. Mecanismo de acción de los OPs.⁽¹⁵⁾

Terminada la acción de la acetilcolina en el órgano diana, es degradada por acción de la AChEasa, la cual hidroliza y se produce ácido acético y una colina, dichos

productos ingresan al proceso metabólico pre sináptico para utilizarse una vez más.⁽²³⁾

2.4.4. Sintomatología y Tratamiento

El período de tiempo entre el contacto con el plaguicida y los síntomas iniciales puede ocurrir a los minutos, esto depende de la clase, concentración y la vía de ingreso del plaguicida. Las respuestas del organismo frente a las intoxicaciones por CPF son el resultado de la hiperactividad colinérgica en el organismo debido a la gran cantidad de acetilcolina acumulada; se clasifican, tomando en cuenta los síntomas, como aumento en la estimulación de los receptores muscarínicos, nicotínicos y del SNC. En el caso del primero, dichos síntomas son visibles a las horas, y se contrarrestan con la administración de sulfato de atropina, entre los síntomas más conocidos tenemos: emesis, dilatación de pupila y sialorrea. Los síntomas nicotínicos se presentan un tiempo más tarde que los anteriores, y ya no es suficiente, revertir los síntomas con la administración de atropina, pero si se puede revertir con la aplicación de oximas, los síntomas más frecuentes son: pérdida de orientación, disminución del nivel de consciencia y parálisis respiratoria.⁽¹⁹⁾

Sintomatología Directa: A parte de los síntomas descritos, que son los principales en cuadros de intoxicación aguda (IA), en algunos casos se observa una acción inmediata a nivel de los parénquimas. De igual modo se observó casos de necrosis en todo el tracto digestivo, necrosis de las vías respiratorias y necrosis hepática y renal.⁽¹⁹⁾

Síndrome intermedio: Terminada la etapa de la intoxicación aguda, pero antes de la neuropatía retardada, algunas personas manifiestan padecer de parálisis de sus brazos y piernas, además de los músculos del cuello; dichos síntomas se presentan en intoxicaciones que no presentan manifestaciones colinérgicas, dicha sintomatología puede producir la muerte, si se involucra a los músculos de las vías respiratorias, dicha sintomatología es llamado por Senanayake (1987) como “síndrome intermedio”.⁽¹⁹⁾

Tratamiento: El tratamiento encaminado a la mitigación del plaguicida del organismo es muy transcendental. Si la persona ingirió el plaguicida, debe realizarse una limpieza del estómago con carbón activado, y seguidamente aplicar medicamentos que induzcan el vómito y/o defecación de forma continua (sulfato de magnesio, entre otros); en caso intoxicación por la piel, la persona debe ser lavada con abundante agua y jabón alcalino.⁽¹⁹⁾

La atropina (sulfato) contrarresta los síntomas colinérgicos, y es el pilar del tratamiento de los pacientes con intoxicación por plaguicidas organofosforados. La atropina únicamente es eficaz en los síntomas muscarínicos, y puede contrarrestar aquellos que perjudiquen la vida del paciente como son la hipersecreción bronquial y bradiarritmias.⁽¹⁹⁾

Oximas: Se utilizan para contrarrestar los cuadros nicotínicos en la intoxicación aguda por el plaguicida clorpirifos; aunque son efectivas para este plaguicida entre otros, su eficacia no está comprobada en las intoxicaciones por otros plaguicidas (dimetoato y fenitrotión). La farmacodinamia de las oximas se basa en reanimar la

enzima colinesterasa mediante la supresión del grupo fosfato de la enzima; dicho mecanismo se diferencia de la atropina, debido a ello, debe aplicarse junto con la de la atropina.⁽¹⁹⁾

2.4.5. Degradación en el medio ambiente

Los mecanismos bióticos y abióticos influyen significativamente en la degradación del plaguicida clorpirifos. El proceso importante es la hidrólisis enzimática, en la cual la tasa aumenta con pH y temperatura. Del mismo modo aumenta la degradación del plaguicida a través de la degradación fotolítica bajo luz del sol.⁽²⁵⁾

No obstante, la principal vía de degradación, suele ser el metabolismo aeróbico y anaeróbico. El metabolito más importante, es el TCP, el cual no se degrada en suelos cuando no se expone a la luz solar. La degradación Hidrolítica puede ser la principal vía de degradación en suelos con pH elevado, en condiciones de poca humedad, sin embargo, se inhibe e inactiva en niveles altos del plaguicida (1000 µg/g) .⁽²⁵⁾

Otras fuentes revelan, que existe otros valores para presión de vapor (PV) y la Constante de Henry (pi), presentándola en múltiples estados: escasamente volátil, de volatilidad moderada, o volátil. Pero, la volatilización puede ser fundamental en la distribución del plaguicida bajo algunos criterios de manipulación, principalmente en uso en el campo, bajo climas templados, en base a una PV de 1.43 mPa (25 °C) y una pi de $2.8 \times 10^{-0.4}$ mostrando que se trata de un analito volátil.^(25,34)

Persistencia

Las pruebas muestran que plaguicida clorpirifos, obedece el límite establecido en el Anexo D 1 para la resistencia en la degradación en suelo y sedimento teniendo en cuenta ciertas consideraciones.⁽²⁵⁾:

- Múltiples estudios basados en controlar la plaga de termiticidas, donde se aplicaron altas tasas del plaguicida, la vida media excedió el límite del Anexo D en 6 meses. La vida media mayor registrada alcanza a 55 meses (aproximadamente) .⁽²⁵⁾
- Período de degradación de 225 días se registró en un sedimento en agua fresca sometiéndola a procesos anaeróbicas.⁽²⁵⁾
- La entidad encargada de regular dicho plaguicida en Australia reportó una vida media de 7 meses para el tiempo de degradación en sedimento de arroyos .⁽²⁵⁾

No se reportó vida media en aguas que sobrepasen el límite máximo. La vida media en agua comprende un período de un mes y medio a 10 °C, casi el doble de lo acostumbrado a 20 °C (medio mes aproximadamente), debido a esto, es muy probable que el tiempo de degradación en mares bajo condiciones de bajas de temperatura como el Ártico, exceda por mucho el límite permitido de 60 días propuesto en el Anexo D.⁽²⁵⁾

Toda la información sobre la vida media bajo condiciones de bajas temperaturas (Ártico) superan los umbrales.⁽²⁵⁾

Del mismo modo que el endosulfán, clorpirifos presenta poca persistencia en climas tropicales, es debido a una degradación por bacterias, fotodegradación y volatilización⁽²⁵⁾ y se observa mayor grado de persistencia en bajas temperaturas, cuando se encuentra en pH ácido y escasa luz. Dichas condiciones son propias del Ártico, y por ello es comprensible que presenta menor degradación en el Ártico. En conclusión, existe estudios que demostró la presencia de dicho plaguicida en el Ártico, tal es el caso de presencia de clorpirifos en hielo, reportado en el año 1971.⁽²⁵⁾

Existe gran información que demuestra que el plaguicida clorpirifos cumple los criterios de persistencia de sustancias química, escrito en el Anexo D1 (b) (ii) de la Convención de Estocolmo.⁽³¹⁾

2.4.6. Legislación, Límite Máximo de Residualidad para el plaguicida clorpirifos en quinua

La producción de quinua presenta grandes retos, tal y como es el control de plagas que perjudican a las semillas de quinua a lo largo de su desarrollo, es por eso que se realiza una serie de aplicaciones de plaguicidas (dicha información se presenta en la parte Anexos), siempre y cuando se respete su período de carencia para evitar sobrepasar los LMRs. Los límites máximos de residualidad (LMR), se refieren a la cantidad de uno o más contaminantes, que debajo de los cuales, no se espera una posible amenaza para la salud de las personas; dichos límites son establecidos por entidades altamente competentes y legalmente reconocidas.

En la actualidad la organización encargada de determinar dichos LMR, es la Comisión del Codex Alimentarius (1963), la cual se originó por la OMS y FAO. Existen entidades que también cuentan con su propia legislación, así tenemos el caso de la Comisión Europea y EPA, como organismos de regulación.⁽³⁵⁾

La quinua no cuenta con un LMR establecido en los Estados Unidos. Sin embargo, SENASA logro registrar algunos plaguicidas utilizados en el cultivo de la quinua en dicho país, tal y como se presenta en la Tabla N°6. En el caso de los destinos como Canadá y la Europa, los requisitos de exportación no son tan estrictos como los Estados Unidos, así tenemos que el LMR del plaguicida clorpirifos en quinua para Canadá es de 0.1 ppm y en la Unión Europea es de 0.05 ppm.⁽²⁾

Tabla N°6. Lista de plaguicidas permitidos en la producción de la quinua-PromPerú.⁽²⁾

Cultivo	País Destino	Ingrediente activo	LMR (ppm)	Fuente de información
Quinua, grano	EE. UU	Azoxystrobin	3	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Carfentrazone-etil	0.1	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Chlorantraniliprole	6	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Etofenprox	5	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Flupyradifurone	3	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Glyphosate	5	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Propiconazole	3	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Pydiflumetofen	4	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Spinetoram	0.04	EPA
Quinua, grano	EE. UU	Spinosad	0.02	EPA

En el caso del Perú, en el 2016 el Ministerio de Salud (Minsa) presentó una norma sanitaria donde indicaba cuales son los LMR de los plaguicidas en quinua. En la Tabla N°7 se presenta dicha información la cual incluye información respecto al plaguicida clorpirifos en quinua.⁽³⁶⁾

Tabla N°7. Límite máximo de residuos de plaguicidas para el cultivo de quinua en el Perú – Minsa .⁽³⁶⁾

Matriz Vegetal	Principio Activo	LMR (ppm)
Quinua, grano seco (<i>Chenopodium quinua</i>)	Abamectina	0.01
	Acetamiprida	0.01
	Azoxystrobina	3
	Benalaxil	0.05
	Clorotalonil	0.01
	Clorpirifos	0.05
	Hidroxido de cobre	10
	oxicloruro de cobre	10
	Cimoxanil	0.05
	Ciazofamida	0.02
	cipermetrina (isómeros)	0.3
	Dimetomorfo	0.01
	Fipronila	0.005
	Fluopicolide	0.01
	Glifosato	5
	Imidacloprid	0.1
	Iprodione	0.02
	Lufenuron	0.02
	Mancoceb	0.05
	Metalaxil	0.05
	Propamocarb	0.01
	Propineb	0.05
	Propiconazole	3
	Spinosad	0.02
	Spinetoram	0.04
	Tiabendazole	0.05

Los LMRs establecidos por el Codex para residuos de contaminantes, se ejecutan mediante estimaciones realizadas por JMPR, después de revisar los resultados obtenidos en ensayos toxicológicos supervisados del contaminante y su residualidad tomando en cuenta la ingesta diaria admisible (IDA).⁽³⁶⁾

2.5. Análisis de residuos de plaguicidas

Para la determinación cualitativa y cuantitativa de residuos de plaguicidas organofosforados en diferente matriz, las metodologías utilizadas son abundantes. Estas permiten la detección de diferentes moléculas basándose en las propiedades fisicoquímicas de las mismas, así tenemos, por ejemplo: ^(37,38)

- Cromatografía de gases – con los siguientes detectores:
 - Detector de masas (GC-MS)
 - Ionización a la Flama (GC-FID)
 - Detector micro captura electrónica (GC-ECD)
 - Detector de nitrógeno y fósforo (GC-NPD)
- Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) (Uv-Vis, DAD, IR, entre otros)

Todas estas técnicas, deben ser acompañadas de óptimas metodologías de extracción y preparación de muestras para asegurar la confiabilidad de los resultados.

2.5.1. Métodos de extracción

Es un proceso donde uno o múltiples analitos, son removidos de una muestra (matriz), la cual puede estar en diferentes estados, mediante un solvente por lo general orgánico (sólidos y líquidos) o un adsorbente (gases).

Los plaguicidas organofosforados como el clorpirifos suelen encontrarse en diferentes matrices ambientales a concentraciones muy bajas, por lo que en algunos casos no es posible cuantificarlo directamente mediante los equipos instrumentales y se ve en la necesidad de emplear metodologías de pre concentración como etapa previa para el análisis de estos compuestos. Entre las metodologías más utilizadas tenemos a la extracción soxleht, extracción líquido – líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), micro extracción en fase sólida (SPME), extracción en fluido supercrítico (SPE) .⁽³⁹⁾

En la práctica la selección del método depende de varios factores, esto requiere que el analista sepa de los fundamentos, procedimientos, pro y contra de todos los métodos conocidos con el objetivo de seleccionar aquel o aquellos más adecuados para la matriz específica bajo estudio para evitar que los resultados obtenidos conduzcan a conclusiones erróneas.

El presente trabajo de investigación se utilizó la extracción en fase sólida para la identificación y cuantificación del plaguicida organofosforado clorpirifos en semillas de quinua.

2.5.1.1. Extracción asistida por ultrasonido

Hizo su aparición en el año 1917 y desde entonces se utilizó en un gran número de aplicaciones, su mecanismo consiste en utilizar sonidos de alta frecuencia, para remover el analito de interés del material vegetal y/o animal. Las partículas comienzan a vibrar y acelerar frente a la fuerza ultrasónica, y se obtiene como resultado el traspase del analito en la matriz al solvente, la presente técnica es una de la menos costosas y no requiere de herramientas instrumentales complejas.⁽⁴⁰⁾

2.5.1.2. Extracción por Soxhlet

Se basa en el lavado constante de un sólido mediante un determinado solvente, el cual extrae los analitos que son más solubles en él, al utilizar dicha técnica, se logra extraer analitos, los cuales presentan una solubilidad escasa por el solvente de extracción, esto es causado por el efecto acumulado de varias extracciones. Debido a esto se necesita realizar la limpieza de impurezas que vienen junto con el analito de interés, por lo general se utiliza técnicas complementarias como EFS.⁽⁴¹⁾

2.5.1.3. Extracción en fase sólida (EFS o limpieza)

En EFS nos permite unir las muestras recolectadas y su posterior determinación.⁽⁴²⁾ Su empleo, data de los años setenta, en esos años se utilizaba columnas rellenas de resinas para condensar moléculas orgánicas en matrices tales como aguas, ya a mediados de los noventa se empieza a desarrollar la técnica de extracción que se conoce hasta ahora.⁽⁴³⁾

La EFS presenta 3 partes, 1 reservorio, 2 filtros y un material adsorbente.

Adsorbentes: polímero inorgánico ((SiO₂) x), dicho adsorbente es el más utilizado en la EFS, por ser económico y de extensa aplicabilidad. Al término de las cadenas y alrededor de su superficie polimérica se halla compuestos (OH), dichos compuestos son responsables de mostrar el aspecto singular de la sílica. Hoy podemos encontrar, sílice enlazada a otros sustituyentes para aumentar o disminuir su polaridad, los que da como resultado un aumento de interacción con moléculas de interés. Existe diversas clases de adsorbentes, entre ellos tenemos a los óxidos de Al, Mg y Ti que tiene un rol muy parecido a los compuestos (OH) de la sílica. Para finalizar, se cuentan también con los adsorbentes hechos a base de polímeros, estos sirven algunas veces para solucionar las dificultades que presentan los óxidos y la sílica, este último de gran capacidad para interactuar con los analitos de interés.^(41,43)

Tipos de EFS:

- **EFS- fase normal con adsorbentes polares:** Fue la primera en ser utilizada, sin embargo, sigue en vigencia su uso. Su principio consiste reaccionar los puentes de hidrógeno entre sí. Dichos puentes de hidrógeno a su vez provienen de los compuestos OH o de la alúmina, gracias a esto, funciona para analitos de mediana y ligera polaridad.⁽⁴⁴⁾
- **EFS - fase normal (sorbentes polares unidos):** Recomendados para moléculas muy polares, debido a las interacciones dipolo-dipolo con la

molécula de interés, esto funciona si y solo si el radical E de la sílica R contenga grupos NH₂, CN o grupos-OH.⁽⁴⁴⁾

- **EFS - fase reversa:** Se refiere a un absorbente que es poco polar a diferencia del eluyente, esto significa, que existe una reacción entre carbono – hidrógeno de las moléculas y de los del sorbentes. Indicada en moléculas apolares.⁽⁴⁴⁾
- **EFS - intercambio catiónico u aniónico:** Es utilizada para remover moléculas que se ionizan fácilmente al cambio de pH.⁽⁴⁴⁾

En la Tabla N°8 se presentan los adsorbentes más utilizados en SPE para múltiples tipos de compuestos.

Tabla N°8. Adsorbentes más utilizados en SPE .^(43,44)

		Fórmula	
	Material de adsorción	abreviada	Estructura Química
Fase normal	sílica gel	Si	-SiOH
	Silicato de magnesio	Florisil	Mg ₂ SiO ₃
	Alúmina (Neutra)	Al-N	Al ₂ O ₃
Fase normal enlazada	Cianopropil	Ciano (CN)	-(CH ₂) ₃ CN
	Propilamino	Amino (NH ₂)	-(CH ₂) ₃ NH ₂
	Diol	(COHCOH)	-(CH ₂) ₃ -O-CHOHCH ₂ OH
Fase reversa	Octadecil	C-18	-(CH ₂) ₁₇ CH ₃
	Octil	C-8	-(CH ₂) ₇ CH ₃
	Fenilpropil	Fenil	-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -ph
	Etil	C-2	-CH ₂ CH ₃
Intercambio catiónico o aniónico	Diámino	NH/NH ₂ (WAX)	-(CH ₂) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂
	Amina cuaternaria	(N ⁺)	-(CH ₂) N ⁺ (CH ₃) ₃
	Acidopropilsulfónico	(SO ₂ OH)	-(CH ₂) ₃ SO ₂ OH

Fases de EFS

La EFS consta de 4 etapas, las cuales son:

- **Acondicionamiento**

Previo al iniciar la extracción, es necesario preparar el relleno con un solvente miscible, en otras palabras, dependiendo de la polaridad del adsorbente se elige el solvente más miscible. Se realiza esto con el fin de desenrollar las cadenas para obtener una gran área de interacción para la molécula de interés tal y como se presenta en la Figura N°10. Es importante evitar que durante este proceso se evite secar el adsorbente debido a que se culminaría con la solvatación. ^(42,43)

- **Adsorción**

La extracción es vertida dentro del adsorbente, en el cual las moléculas de interés son capturadas, este paso se puede realizar utilizando un equipo de bomba al vacío. Para regular el flujo tomando en cuenta el tamaño de la columna. ^(42,43)

- **Lavado**

Esta etapa suele ser muy crítica ya que se debe tener en cuenta que solvente se elegirá para remover las interferencias presentes en la muestra, dicho solvente debe ser específico o de polaridad similar con los interferentes, para evitar perder a las moléculas de interés. Por lo general es recomendable secar el adsorbente después de esta etapa. ^(42,43)

- Elución

Esta etapa consiste en eluir las moléculas retenidas por el adsorbente al solvente orgánico, quien a su vez presenta una elevada polaridad a comparación del adsorbente para así transportar a las moléculas de interés y realizar las mediciones analíticas correspondientes. Después que los analitos de interés son eluidos, se procede a la identificación y cuantificación por diversas técnicas, una de ellas es mediante un equipo de cromatografía de gases.^(42,43)

La Figura N°11 se presenta las 4 etapas de SPE.

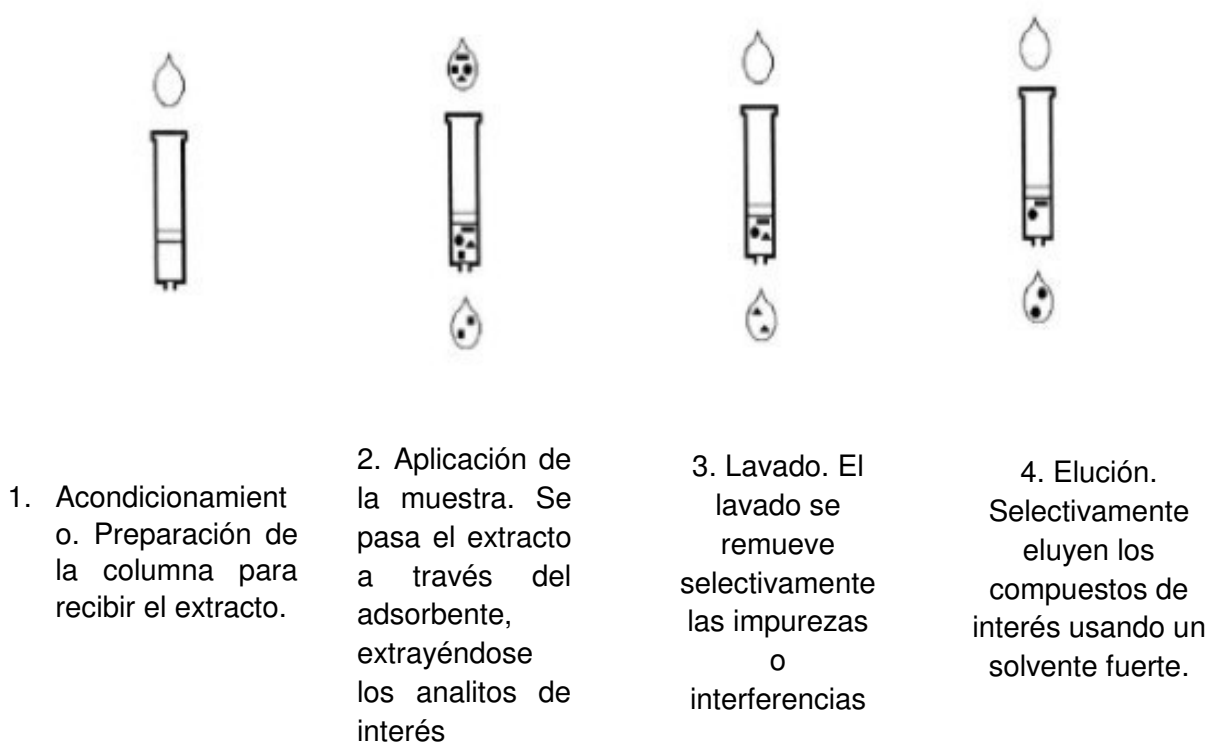


Figura N°11. Fases de la extracción en fase sólida (SPE) .^(42,43)

2.6. Cromatografía de gases

Según la IUPAC: es una metodología física de separación. Donde las moléculas de interés son separadas y repartidas en 2 fases, una estacionaria y la otra móvil. Transportándose con una dirección establecida.⁽⁴⁵⁾

Esta técnica es altamente utilizada en ámbito de la separación y determinación de analitos en estado gaseoso. Además cuenta con la tecnología para identificar (conocer la estructura química) y cuantificar (cantidad de dicho analito), las moléculas, las cuales pueden ser una o múltiples, explican la cinética y el mecanismo de reacción, esto al mismo tiempo permite solucionar los dilemas en otros campos analíticos, como es el campo farmacéutico para verificar la biodisponibilidad en matrices biológicas, en la petroquímica, identificando analitos contenidos en petróleo y sus derivados, en el sector alimentario caracterizando antioxidantes y preservantes; también es altamente utilizada en la identificación y cuantificación de agroquímicos y residualidad en múltiples muestras.⁽⁴⁶⁾

En la presente técnica, el gas de arrastre (fase móvil) es transportado a través de una columna capilar, la cual contiene la fase estacionaria. Dicha fase está compuesta por un sólido poroso (sólido - gas), también puede estar constituida por un “film” líquido delgado que cubre una partícula sólida, o dentro de la columna capilar (líquido – gas). Al interior del cilindro, se encuentra almacenado un gas, el cual puede ser hidrógeno, nitrógeno o un gas noble, el cual es constantemente transportado dentro de la columna cromatográfica, y con una fuente de calor y velocidad establecidos. Se inyecta una porción del extracto para el análisis

cualitativa y cuantitativo, generalmente se usa una micro jeringa, en el puerto de inyección, en el cual la muestra es volatilizada rápidamente. El flujo del gas transportador direcciona los analitos de interés en toda la columna. El Helio o Hidrógeno son transportados a múltiples flujos, por lo cual eluyen en diversos tiempos. Los analitos de interés son eluidos además por procesos fisicoquímicos. La señal emitida por los detectores es llevada a un software donde es registrada, esto luego de haber sido integrada electrónicamente.⁽⁴⁷⁾

2.6.1. Partes de un cromatógrafo de gases

- Fase móvil

Dicha fase está compuesta por un gas inerte y altamente puro, entre los gases más utilizados y conocidos tenemos por ejemplo al gas Helio, debido a que se trata de un gas que posee alta eficacia y flujos altos.⁽⁴⁷⁾

En la Figura N°12 se presenta todas las partes de un cromatógrafo de gases.

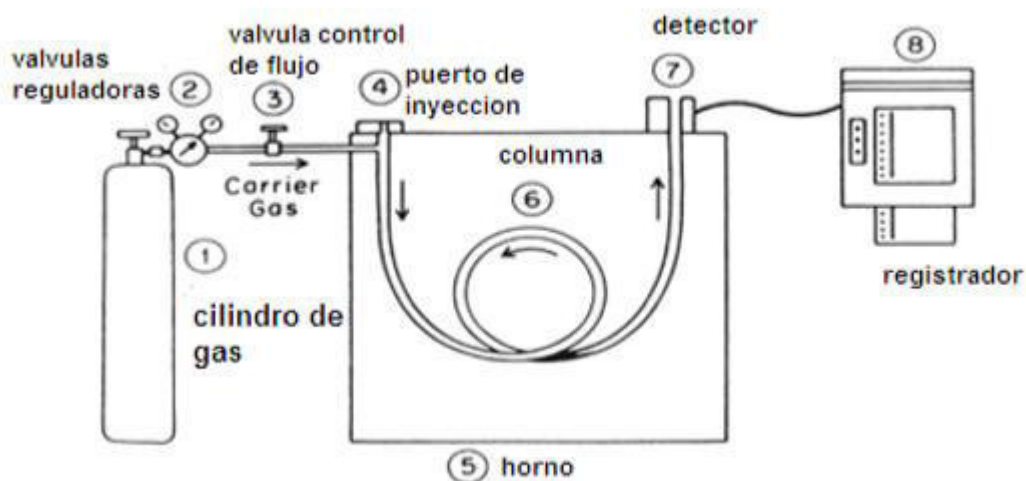


Figura N°12. Partes básicas de un equipo de cromatografía gaseosa.⁽⁴⁷⁾

En algunos casos a pesar de utilizar gases inertes, existe algunos detectores, que no es suficiente dicha característica, tal y como es el caso del detector de captura de electrones. Dicho detector necesita además de nitrógeno, debido a que dicho gas cuenta con una gran conducción térmica.⁽⁴⁷⁾

- **Sistemas de inyección de los analitos**

El inyector es fundamental para mantener la integridad de la columna, así como para la resolución en los cromatogramas. Dicha etapa consiste en utilizar una microjeringa, la cual moviliza la matriz líquida o gaseosa y perfora una base de caucho o sílice llamada septum a un compartimiento de vapor, en dicho compartimiento se encuentra a altas temperaturas, por lo general es mayor a la temperatura de ebullición del analito de interés. El inyector cuenta además con un septum, liner de vidrio que se halla al interior del compartimiento de vaporización, un sistema Split/splitless, válvulas que controlan los flujos de los gases. Existen 2

tipos de inyectado, uno llamado Split (con división), el mismo funciona de la siguiente manera: si se inyecta 1 μL de muestra, esta se volatiliza y se fracciona en 2 partes idénticas, una fracción logra ingresar dentro de la columna y la segunda fracción es desechada mediante una válvula de salida. Las moléculas que logran penetrar en la columna son del 0.3 al 20 % de la muestra ingresada en el puerto de inyección.⁽⁴⁸⁾

El otro modo de inyección denominado splitless (sin división) consiste en inyectar de 1 a 5 μL , tiene el mismo mecanismo que el Split, sin embargo, en este caso la muestra no se divide en 2, sino ingreso totalmente a la columna en un tiempo determinado, esto es posible debido a que la válvula Split está cerrada. El presente sistema de inyectado es ampliamente utilizado en circunstancias donde, los analitos de interés se encuentran a un nivel de trazas.⁽⁴⁸⁾

En la Figura N°13, se presenta las partes básicas del inyector.

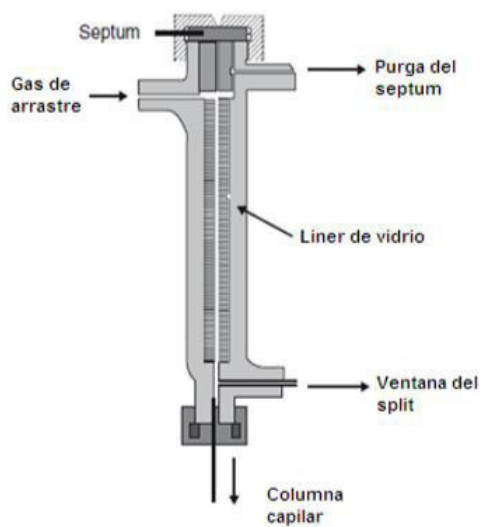


Figura N°13. Puerto de inyección.⁽⁴⁸⁾

- Fase estacionaria

Es la parte fundamental en un análisis por cromatografía gaseosa. Dicha fase puede ser sólida o líquida, en el caso de columnas capilares, dichas fases son cubiertas desde la parte interna de la columna.

Estimar la cantidad de la polaridad de una fase estacionaria puede convertirse en una ardua tarea, debido a que dicha fase contiene múltiples interacciones moleculares (fuerzas de van der Waals, puente de hidrógeno, dipolo – dipolo) además de contar con una dificultad, como es el alto calor, ocasionando la fragmentación de las columnas y distorsión del background.⁽⁴⁶⁾

- Columna

En esta parte del equipo es donde se lleva a cabo la separación de las moléculas, debido a que dentro, contiene fase estacionaria (sólido o líquido). Las columnas cuentan con tres secciones básicas, 1) tubo de acero, el cual contiene el adsorbente, 2) lana de vidrio o metal poroso colocados al final del tubo y 3) el relleno (sólido o cubierto de una fase líquida). La primera sección tiene que contar con ciertas especificaciones, tal y como tener un área extensa (1 a 20 m^2/g), material poroso con diámetro variado y por debajo de los 10 μm de porosidad, sin interactuar de ninguna forma con la matriz, las partículas de dimensión y forma variada, para culminar, contar con resistencia mecánica y no quebrarse fácilmente.⁽⁴⁹⁾

- Tipos de columna

Existen 2 clases, columnas de relleno (empacadas) y las columnas capilares

- **Columnas empacadas**

Fueron las pioneras en ser creadas (para GC), presentaban un largo aproximado de 1 a 10 m, D.I de 2 – 5 mm hasta 5cm, espesor de película casi 20 veces por debajo del radio del tubo. Y disponían de grandes cargas, proporción de fases baja y escasa penetrabilidad.⁽⁴⁵⁾

En la Figura N°14 se presenta un ejemplo de columna de relleno.



Figura N°14. Columna de relleno.

- **Columnas capilares**

Las columnas capilares cuentan con un grosor de “film”, el cual recubre la parte interna de la columna. Por lo general existe 3 clases de columnas; muros cubiertos (WCOT), revestimiento de soporte (SCOT) y de placa adsorbente y porosa (PLOT). La de pared recubierta cuentan con diámetros internos, los cuales oscilan entre 0.1 a 0.53 mm, además cuentan con longitudes entre los 10 a 100 m y un espesor de “film” de 0.1 a 50 μm , además se encuentran elaboradas a base de sílica fundida. Las de soporte revestido, contiene un espesor de “film” muy parecido WCOT, sin embargo, estas no se encuentran constituidas mediante sílice fundido, además no se saturan frente a mayor fase líquida y mayor cantidad de muestra. Las PLOT por su parte presentan poros adsorbentes (hechas por lo general de óxido de aluminio), el grosor de soporte, de 0.5 a 50 μm y sus longitudes oscilan entre 10 a 30 m.⁽⁴⁵⁾

En la Figura N°15, se presenta un modelo de columna capilar



Figura N°15. Columna capilar (TG-5MS, Thermo Scientific)

- **Detector**

La cromatografía gaseosa cuenta con un variado sistema de detectores, es importante conocer las propiedades fisicoquímicas del analito para escoger el óptimo, ya que teniendo en cuenta dichas propiedades se obtendrá un mejor desempeño en el proceso. En el momento de elegir un detector eficiente, este debe contar con una alta sensibilidad, estabilidad, reproducibilidad, tiempo de respuesta lo más breve posible, robusto, fácil de usar y programación de temperatura correcta.⁽⁵⁰⁾

Entre los detectores más utilizados por la cromatografía de gases encontramos al de ionización a la flama (FID), microcaptura de electrones (ECD), Conductividad térmica (TCD) y un detector fotométrico a la flama (FPD), especial para moléculas que contienen azufre y fósforo, entre otros.⁽⁵⁰⁾

A continuación, se presentan las características de un detector:

• **Selectividad**

Se ha observado que, en algunos casos, los detectores muestran respuesta cromatográfica ante cualquier analito diferente al gas de arrastre. Dichos detectores son conocidos como detectores universales. De igual manera, se evidencian detectores que emiten respuesta a moléculas que cuentan con un átomo específico unido a dicha molécula, a los cuales se les denominan selectivos. En algunos casos, los detectores presentan una combinación en la respuesta.⁽⁵⁰⁾

- **Background**

Son las desviaciones y variaciones en la línea base (respuesta del detector ante únicamente la fase móvil). En algunos casos es ocasionado por problemas electrónicos interferentes o sustancias encontradas en la fase móvil y/o detectores. No importa la clase del equipo, siempre existirá background.⁽⁵⁰⁾

- **Tipo de señal**

Se ha demostrado que los detectores, emiten una respuesta, la cual varía directamente proporcional a la cantidad del analito en la fase móvil; sin embargo, en algunos casos la respuesta es dependiente a la porción del peso molecular que ingresa al detector. Esta propiedad es diferente en cada detector.⁽⁵⁰⁾

- **Cantidad mínima detectable (CMD)**

Mínima cantidad para producir una señal de mayor intensidad que el ruido (2 ó 3 veces más). Es una propiedad de todas lo detectores, cuanto más bajo sea la cantidad mínima detectable, se dice que el detector es más sensible.⁽⁵⁰⁾

- **Rango de trabajo**

Relación aritmética entre la cantidad de analito y el área cromatográfica (en algunos casos altura de pico), la cual se mantiene constante desde la concentración más baja hasta la más alta. Es representado por una curva de calibración lineal.⁽⁵⁰⁾

2.6.2. Detector de Captura de electrones (ECD)

Dicho detector, es ampliamente utilizado para el análisis de muestras ambientales, ya que responde de manera específica a moléculas que contienen átomos de cloro, bromo, yodo, entre otros, como agroquímicos y bifenilos policlorados.⁽⁵⁰⁾

Fundamento: En este detector, el eluyente de la muestra de una columna pasa sobre un emisor de radiación beta, usualmente níquel 63. Un electrón del emisor causa la ionización del gas portador (en muchos casos, nitrógeno) y el flujo de una corriente de eléctrica. Cuando no existen moléculas orgánicas, este fenómeno genera flujo eléctrico continuo entre un par de electrodos. No obstante, el flujo se reduce cuando existen moléculas orgánicas, las cuales contienen átomos altamente electronegativos, que tienden a capturar electrones. Los compuestos del tipo de los halógenos, peróxidos, quinonas y grupos nitro se detectan con alta sensibilidad. El detector carece de respuesta frente a aminas, hidrocarburos y alcoholes. Este detector es altamente sensible, y además no destruye la matriz (a diferencia del detector de ionización a la llama, que la consume). Empero, el rango lineal del detector es limitado.⁽⁵⁰⁾

En la siguiente figura se presenta al detector ECD.

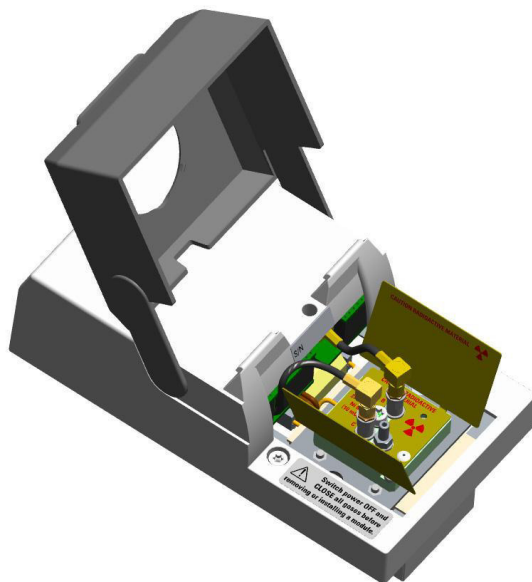


Figura N°16. Detector de captura de electrones (Thermo Scientific)

2.7. Validación de métodos analíticos

Si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados emitidos a través de una metodología analítica y prevenir determinaciones “engañosas” se debe realizar una estricta evaluación del método.⁽⁵¹⁾

En la Unión Europea, en lo referente a validación, son de aplicación las guías SANTE, dichas guías establecen las pautas que deben acotar las metodologías implementadas para el análisis de plaguicidas y para constatar los LMRs. En el presente trabajo de investigación se utilizó la guía SANTE/11945/2017 referido a técnicas analíticas para la determinación de plaguicidas y su residualidad en vegetales. A continuación, tomando en cuenta las recomendaciones de la guía SANTE, se presentan las etapas para validar la metodología para la determinación de plaguicidas por cromatografía de gases según la Comisión Europea (2017).⁽⁵¹⁾

2.7.1. Exactitud

Es definida como la concordancia entre el valor de un ensayo y el valor de referencia aceptado como verdad (material de referencia, estándar analítico). Los procesos normalmente utilizados para estimar la exactitud de una metodología son: uso de materiales de referencia y realización de ensayos de recuperación.⁽⁵¹⁾

2.7.2. Linealidad

Es la capacidad de una metodología, dentro de un rango de concentración, dar un resultado instrumental que varía proporcionalmente a la cantidad del analito que se determinará en el ensayo de laboratorio.⁽⁵¹⁾

2.7.3. Precisión

Grado de concordancia entre las mediciones obtenidas independientes bajo condiciones establecidas y se halla en función de la repetitividad y reproducibilidad.⁽⁵¹⁾

- Repetitividad

Es la medida de la precisión de un método efectuado bajo condiciones iguales, sobre el mismo analito, con el mismo método, el mismo analista, utilizando los mismos instrumentos de medida y en un intervalo tiempo.⁽⁵¹⁾

- Reproducibilidad

Es la variación observada por diferentes operadores cuando realizan una medición muchas veces, usando el mismo sistema de medición, bajo las mismas condiciones.⁽⁵¹⁾

2.7.4. Límite de Detección

Se explica como la cantidad de analito más pequeña, la cual es detectable en la muestra, pero no se puede cuantificar. Por lo general se obtiene multiplicando 3.3 veces la desviación estándar del blanco dividido entre la pendiente de la curva de calibrado.⁽⁵¹⁾

2.7.5. Límite de cuantificación

Cantidad del analito más pequeña que se puede cuantificar. Por lo general se obtiene multiplicando 10 veces la desviación estándar del blanco dividido entre la pendiente de la curva de calibrado.⁽⁵¹⁾

2.7.6. Selectividad

Dicho parámetro permite determinar cuali y cuantitativamente las moléculas de interés, y discernir entre otras moléculas que se encuentran en la matriz, según lo indicado en la metodología. Se realiza mediante el análisis de una muestra blanco y una muestra blanco-fortificada a la concentración más pequeña de la curva de calibración. Con este ensayo se desea evitar reportar falsos positivos.⁽⁵¹⁾

Tomando en cuenta las especificaciones mencionadas, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo evaluar la residualidad del plaguicida clorpirifos en

semillas de quinua provenientes del distrito de La Molina en Lima. Mediante una metodología validada, la cual se realizará por extracción en fase sólida (EFS) y la identificación y cuantificación del analito mediante la cromatografía de gases con un detector de microcaptura electrónica (GC-ECD) .⁽⁵¹⁾

III. METODOLOGÍA

3.1. Recolección de la muestra

Las muestras fueron colectadas en el distrito de la Molina, en la provincia de Lima (Instituto Nacional de Innovación Agraria) en el mes de marzo del 2018. La producción de semillas de quinua estuvo a cargo de una investigación por parte del INIA, los cuales cultivaron y cosecharon 12 variedades de quinua.

Por cada variedad cosechada se tomó 1 kg de semillas de quinua para el análisis, dicha cantidad es la mínima para realizar los análisis de plaguicidas en cereales según FAO (1994).⁽⁵²⁾ En la Figura N°17 se presenta el mapa donde se llevó a cabo la producción y cosecha de quinua.



Figura N°17. Ubicación de la procedencia de las semillas de quinua en el distrito de La Molina- Lima. Perú.⁽⁵³⁾

3.2. Materiales

- Materiales de laboratorio

- Fiolas de 2, 5 y 10 mL
- Micropipetas 10- 100 μ L y 1 – 10 mL
- Beakers 50 mL
- Viales de color ámbar con tapa
- Tubos de vidrio tapa rosca (20 mL)
- Papel Whatman N°1
- Embudos de vidrio
- Filtro con membrana 0.45 y 0.22 μ m
- Jeringas 10 mL
- Papel de aluminio
- Papel parafilm

3.3. Equipos y reactivos de laboratorio

- Equipos

- Cromatógrafo de gases (Thermo Scientific, Trace 1300)
- Columna capilar L: 30m D.I.: 0.25mm E.P.: 0.25 μ m (Thermo Scientific, TG-5MS)
- Multieaporador (Buchi,
- Molino (Restch, ZM 200)

P-6)

- Balanza analítica (AND, HR-250AZ)
- Sistema de extracción en fase sólida (Waters, WAT200677)
- Bomba al vacío (Buchi, V-700)
- Sonicador (BRANSON, 3510-DTE)
- Sistema de gases (Helio, Nitrógeno) (Linde).

- **Reactivos**

- Gas Helio 99 % pureza (Linde)
- Gas Nitrógeno 99 % pureza (Linde)
- Acetato de etilo (HPLC, Merck)
- Metanol (HPLC, Merck)
- Fase estacionaria 5 % difenil 95 % dimetilpolisiloxano.
- Estándar Clorpirifos – 100 ppm (Sigma – Aldrich)
- Octadecilo (C18) – 1 g (Sep Pak – Waters)

- **Software**

- El almacenamiento y procesamiento de los datos del sistema de cromatografía de gases acoplado al detector de captura de electrones (CG-ECD) se realizaron mediante el programa Chromeleon 7.2 SR4.
- Excel, Microsoft office 2013 para la elaboración de hojas de cálculo, obtención de las rectas de calibrado, etc.
- Programa Minitab 17 para la elaboración y estudio de análisis estadísticos.

3.4. Parte experimental

3.4.1. Tratamiento de la muestra

Los granos de quinua fueron depositados en bolsas de aluminio debidamente selladas, libres de la exposición a la luz, seguidamente fueron almacenadas a – 20 °C. Se homogenizaron mediante el equipo molino de alto impacto (Restch, ZM 200) y fueron nuevamente depositadas en bolsas de aluminio y almacenadas a – 20 °C. El análisis del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua en el período de cosecha fue realizado en el laboratorio de Investigación Nutricional y Funcional de los Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).

3.4.2. Preparación de curva de calibrado

La curva de calibrado se realizó tomando en cuenta los siguientes pasos:

- Preparar una solución stock (1 ppm) a partir del estándar del plaguicida clorpirifos (100 µg/mL). Para este propósito, se tomó una alícuota del estándar clorpirifos, una cantidad de 0.25 mL y se llevó a un fiola de 25 mL

y se enrasó con el solvente acetato de etilo (HPLC). Obtenemos una concentración de 1 ppm (p/v) del plaguicida clorpirifos

- Para preparar soluciones del plaguicida clorpirifos (0.005, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 mg/L) en fioles de 25 mL, se mide alícuotas de 0.125, 0.625, 1.25, 1.875, 2.5 mL de la solución stock del plaguicida clorpirifos (1 ppm). Una vez terminada la preparación de las soluciones, inyectar 1 µL en el GC-ECD bajo las condiciones mencionadas en el punto 3.4.4.

3.4.3. Extracción, limpieza del extracto y su posterior análisis por GC-ECD

- Pesar 1000 g de semillas de quinua en la balanza analítica (AND, HR-250AZ).
- Moler las semillas de quinua en el molino de alto impacto (Restch, ZM 200).
- Pesar 2.0 g de muestra homogenizada dentro de un beaker de 50 mL utilizando balanza analítica (AND, HR-250AZ) con una precisión ± 0.001 .
- Agregar 6 mL de acetato de etilo grado HPLC y sellar el beaker con papel parafilm.
- Llevar el macerado a baño de ultrasonido por 35 minutos en el equipo BRANSON 3510
- Filtrar el macerado a través papel filtro marca Whatman N°1
- Lavar el filtrado con 5 porciones de 2 mL acetato de etilo (HPLC, Merck)
- Activar los Cartucho C18 con una porción de 2 mL de metanol (HPLC, Merck), y una porción de 2 mL acetato de etilo (HPLC, Merck)
- Dejar pasar la muestra suavemente por goteo sobre el cartucho C18 activado, finalmente eluir con 2 porciones de 2 mL de acetato de etilo.

- Concentrar a sequedad el macerado en el Multievaporador (Buchi, P-6) al vacío con un baño maría a 30 °C.
- Reconstituir el extracto en 1 mL de acetato de etilo (HPLC, Merck)
- Diluir 0.1 mL del reconstituido en 1 mL en acetato de etilo
- Filtrar el reconstituido a través de un filtro con membrana 0.45 µm
- Colocar 1 mL en un vial ámbar con tapa perforable.
- Inyectar 1 µL del diluido al CG-ECD.

En la Figura N°18 se presenta el flujograma del procedimiento de extracción y limpieza del extracto.

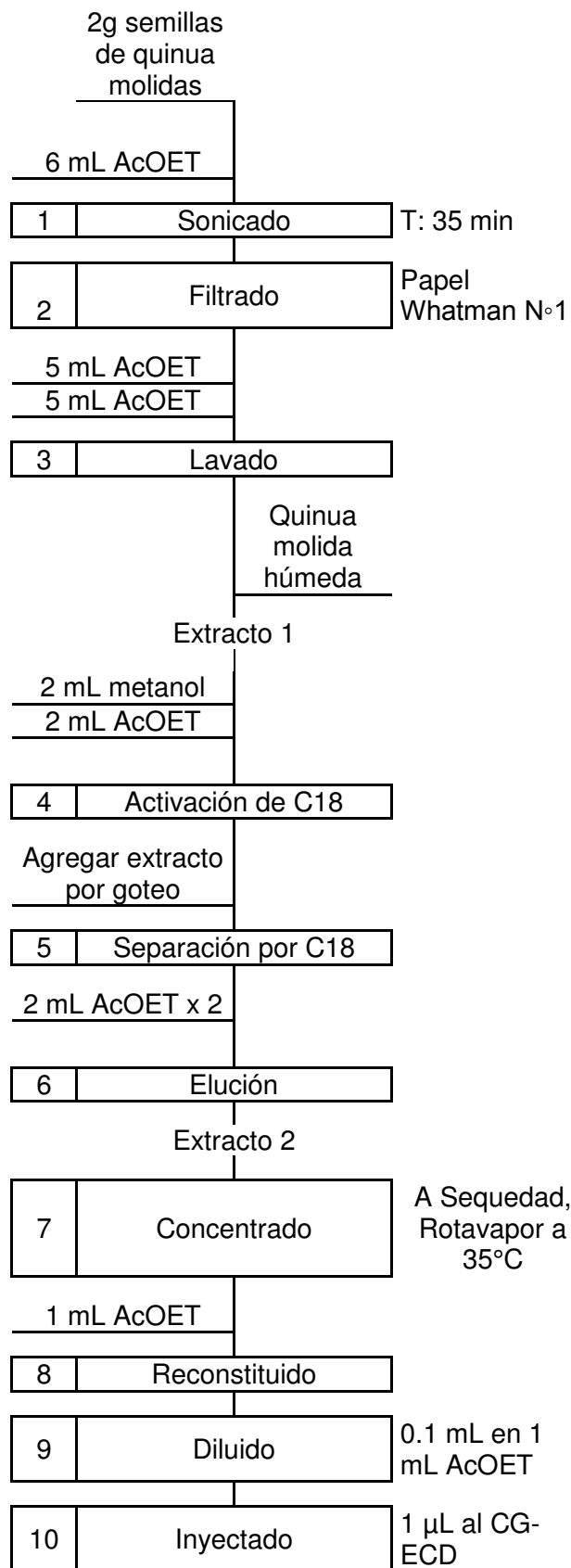


Figura N°18. Método de extracción, clean-up e identificación por GC-ECD del plaguicida organofosforado clorpirifos en semillas de quinua, Fuente: Elaboración propia.

3.4.4. Análisis de las muestras mediante el equipo cromatografía de gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases Trace 1300 de la marca Thermo Scientific, las condiciones cromatográficas establecidos para la determinación cromatográfica son presentados en la parte inferior, es importante saber que para el análisis del plaguicida organofosforado clorpirifos la columna capilar utilizada fue TG-5MS, la identificación y cuantificación se realizó con el detector de captura de electrones ECD

Las condiciones cromatográficas bajo las cuales se realizó los análisis de quinua para la determinación del plaguicida clorpirifos, se presentan a continuación en la Tabla N°9:

Tabla N°9. Condiciones del equipo GC-ECD, para la determinación de clorpirifos

Condiciones cromatográficas	Descripción
Temperatura inyector	300 °C
Temperatura de detector	250°C
Flujo del gas Carrier (Helio)	1 mL/min
Flujo del gas make-up (Nitrógeno)	15 mL/min
Volumen de inyección	1 µL
Tiempo splitless	0.75 min

En la Tabla N°10 se presenta la rampa de temperatura utilizada para el análisis de clorpirifos

Tabla N°10. Rampa de temperatura

Velocidad de calentamiento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	40	1
25	230	4.5
30	300	5
		12

El tiempo total de análisis por CG-ECD fue de 12 minutos. Finalizado el proceso de extracción, se procede a analizar mediante un equipo de cromatografía gaseosa, bajo condiciones similares, en las que se analizó los estándares analíticos. El análisis cualitativo se realizó utilizando el tiempo de retención obtenido en el análisis de las muestras, sometiéndolas a comparación con los obtenidos en los cromatogramas del estándar; la cuantificación del analito se determina mediante la curva de calibrado, la cual se obtiene al enfrentar el área cromatográfica versus la cantidad del estándar.

Validación del método analítico

La evaluación de la metodología se llevó acabo según la guía SANTE/11945/2017 de la Comisión Europea. Se eligieron los siguientes criterios: Linealidad, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación y selectividad.⁽⁵¹⁾

- **Selectividad**

La selectividad del método fue evaluada comparando una muestra de quinua libre del plaguicida clorpirifos y una muestra de quinua fortificada con el plaguicida clorpirifos a la concentración de 0.025 ppm (mg/kg)

- **Linealidad**

Para el presente trabajo de investigación, el rango lineal de la metodología. Se preparó diluciones de concentración conocida, partiendo del patrón analítico de Clorpirifos (Sigma-Aldrich).

Se analizaron cinco concentraciones diferentes, por quintuplicado para las siguientes concentraciones: 0.005, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 mg/kg. Dichas concentraciones se realizaron tomando en cuenta los LMR establecidos por la Comunidad Europea, Canadá y los Estados Unidos. Para la determinación de este parámetro se tomó en cuenta las condiciones cromatográficas previamente descritas.⁽²⁾

- **Exactitud**

Para evaluar este parámetro, se tomó en cuenta los porcentajes de recuperación. Para esto, se fortificaron 15 blancos con el patrón de clorpirifos a 3 niveles de concentración: 0.025, 0.05 y 0.1 ppm (5 repeticiones por concentración).

Los criterios para aprobar la precisión (RSD) y exactitud (sesgo) se tomó en cuenta la guía SANTE/11945/2017. El cual exige que el porcentaje de recuperación debe encontrarse entre 70 – 120 % con una desviación estándar relativa máxima de 20 %.⁽⁵¹⁾

- **Precisión**

Dicho parámetro se determinó en conjunto con la exactitud, para ello se estimó el coeficiente de variación de los porcentajes de recuperación de los 3 niveles concentración del fortificado (0,025, 0.05 y 0.1 ppm de plaguicida clorpirifos) por quintuplicado. La precisión intermedia se realizó realizando los mismos ensayos en un día diferente y por un analista diferente.⁽⁵¹⁾

- **Límites de detección y cuantificación**

Los límites de detección y cuantificación son calculados utilizando la curva de calibración, donde el límite de detección se determinó como 3.3 veces la desviación estándar del blanco sobre la pendiente de la curva y el límite de cuantificación se calculó como 10 veces la desviación estándar del blanco sobre la pendiente de la curva.⁽⁵¹⁾

IV. RESULTADOS

Resultados de los análisis del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua producidos en el distrito de la Molina en la Región Lima.

Una vez realizada la validación del método analítico se procedió al análisis de las muestras. Se realizaron el análisis de 13 muestras, de las cuales 12 provienen del distrito de la Molina, la cuales fueron utilizadas para identificar y cuantificar el plaguicida clorpirifos. La muestra faltante, proviene del distrito de Omas, la cual fue cosechada en un sistema de producción orgánica (libre de plaguicidas), dicha muestra fue utilizada para la validación del método analítico

Previamente para realizar los cálculos de las concentraciones del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua se utilizó la siguiente fórmula

$$C_m = \frac{C_{ext} * V_{ext} * F_d}{m}$$

Donde

C_m: concentración del plaguicida en la muestra (mg/kg)

C_{ext}: concentración del plaguicida en el extracto medido en el cromatógrafo de gases (µg/L)

V_{ext}: volumen final del extracto (L)

F_d: factor de dilución

m: masa de la muestra (kg)

En la Tabla N°11 se presentan las concentraciones de las muestras con residuos del plaguicida clorpirifos y sus LMRs respectivos.

Tabla N°11. Resultados de análisis de muestras de quinua reales – PromPerú.⁽²⁾

Muestra	Plaguicida	Concentración (mg/kg)	LMRs (mg/kg)			
			Codex	Unión Europea	Perú	Canadá
M1	clorpirifos	0.024 ± 0.046	-	0.05	0.05	0.1
M2	clorpirifos	0.023 ± 0.043	-	0.05	0.05	0.1
M3	clorpirifos	0.04 ± 0.068	-	0.05	0.05	0.1
M4	clorpirifos	0.08 ± 0.03	-	0.05	0.05	0.1
M5	clorpirifos	0.136 ± 0.078	-	0.05	0.05	0.1
M6	clorpirifos	0.008 ± 0.09	-	0.05	0.05	0.1
M7	clorpirifos	0.01 ± 0.18	-	0.05	0.05	0.1
M8	clorpirifos	0.022 ± 0.03	-	0.05	0.05	0.1
M9	clorpirifos	0.007 ± 0.032	-	0.05	0.05	0.1
M10	clorpirifos	0.019 ± 0.09	-	0.05	0.05	0.1
M11	clorpirifos	0.023 ± 0.045	-	0.05	0.05	0.1
M12	clorpirifos	0.009 ± 0.015	-	0.05	0.05	0.1

LMR: Límite Máximo residual. Valor promedio de 4 repeticiones

En las Figuras N° 19, 20 y 21 se presentan los resultados de los análisis de las 12 muestras de quinua provenientes el distrito de La Molina de la Región Lima comparando con la legislación peruana, canadiense, europea y estadounidense.

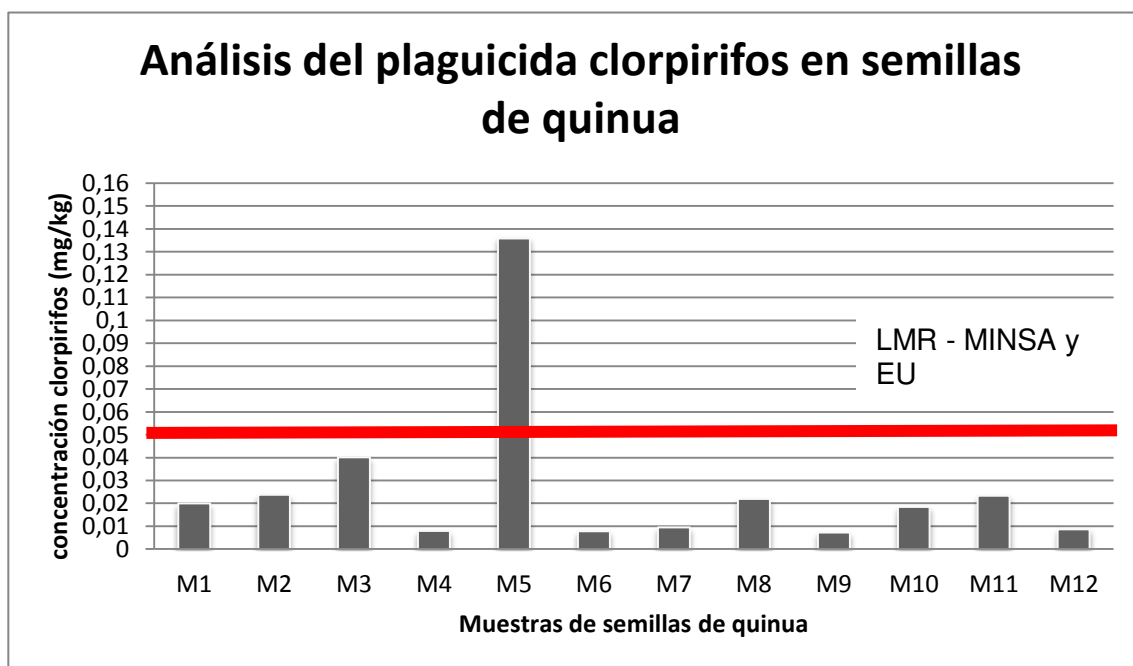


Figura N°19. Análisis del plaguicida clorpirifos según legislación Minsa y Europa.

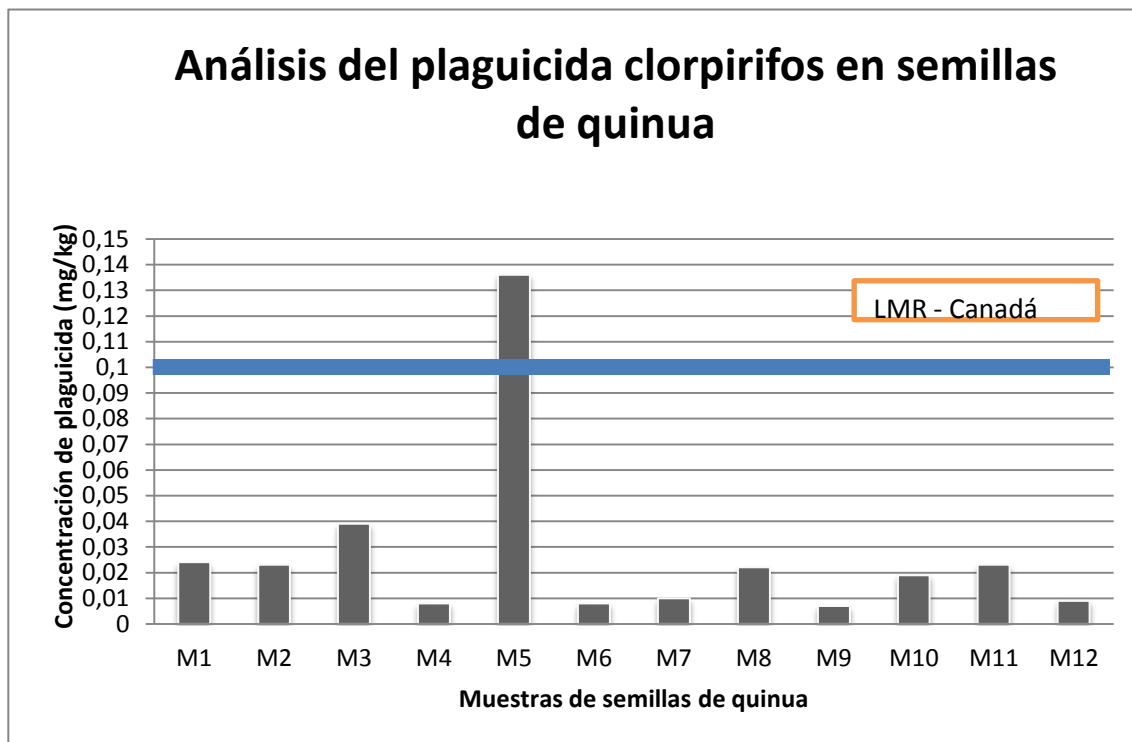


Figura N°20. Análisis del plaguicida clorpirifos según legislación de Canadá

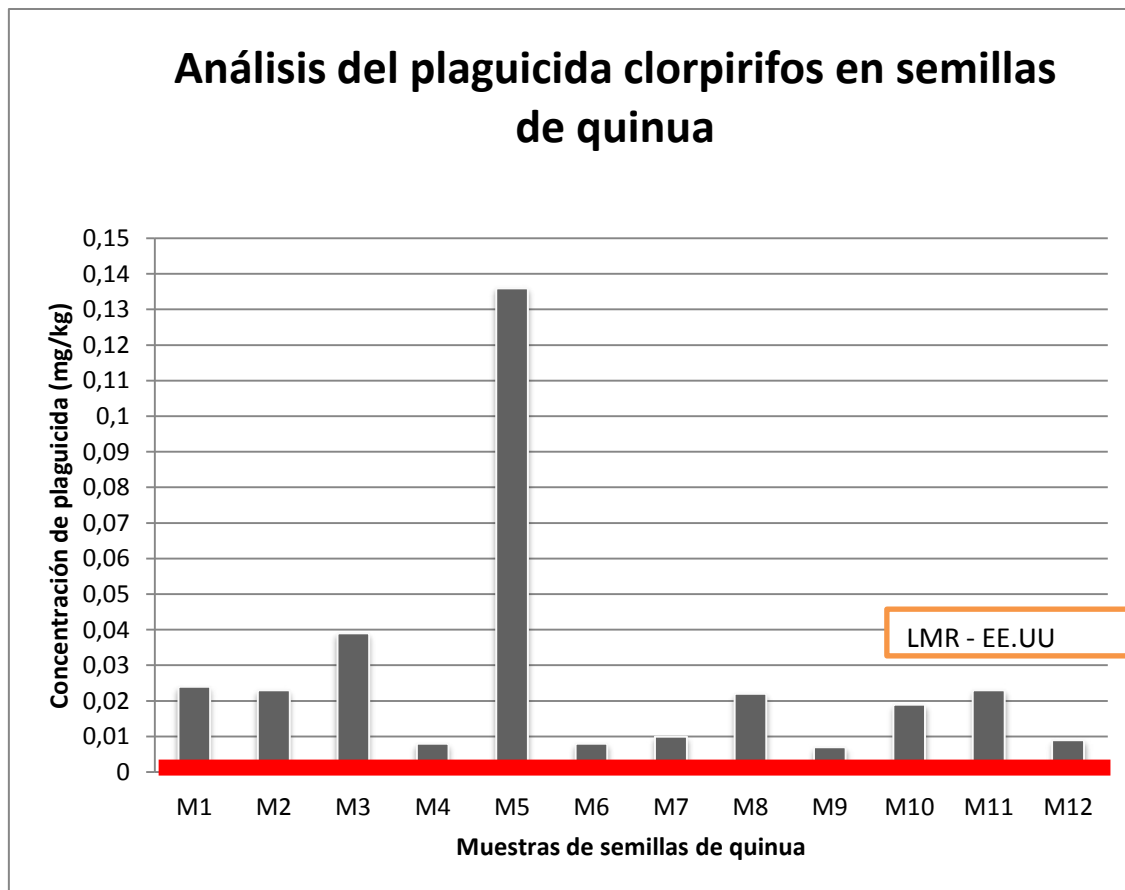
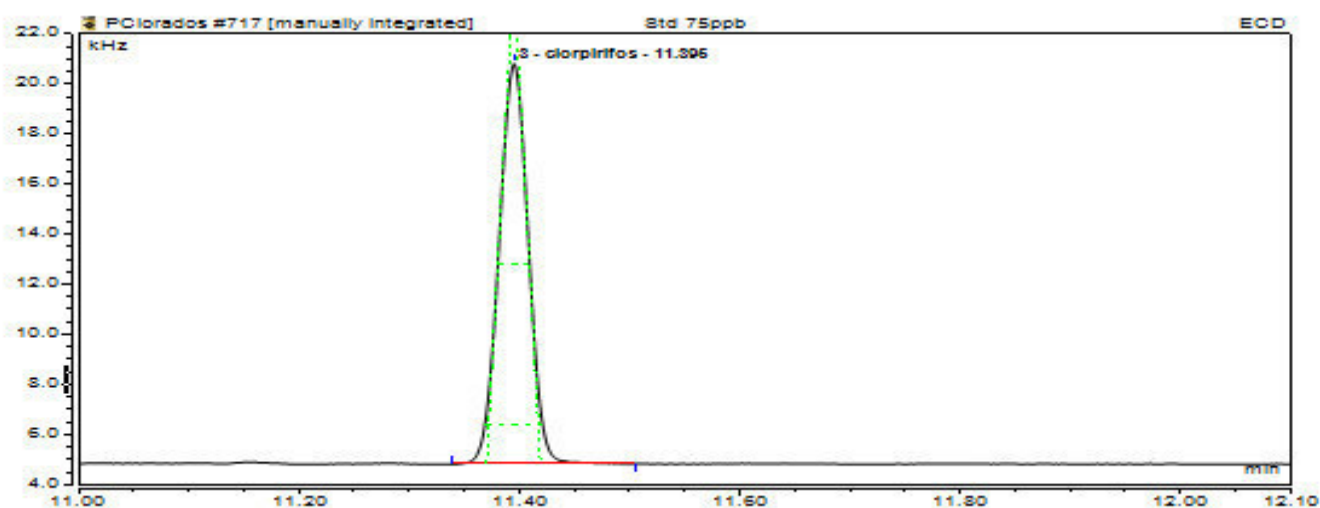


Figura N°21. Análisis del plaguicida clorpirifos según EE.UU

Resultados de los parámetros de validación según la guía europea SANTE/11945/2017.

➤ Condiciones cromatográficas

En la Figura N°22 se presenta el pico cromatográfico correspondiente al plaguicida clorpirifos, identificado por GC-ECD utilizando las condiciones cromatográficas descritas en el punto 3.4.4. Además, el cálculo de los platos teóricos se presenta en la sección Anexos.



Analito	Tiempo de retención (min)	Asimetría	N° Platos Teóricos
Clorpirifos	11.395	1	864250

Figura N°22. Identificación del analito clorpirifos por GC-ECD.

➤ Análisis de la selectividad de la metodología

En la Figura N°23 se presenta el cromatograma obtenido de fortificar una muestra de quinua libre de plaguicida, y una fortificada con el plaguicida clorpirifos a la concentración de 0.025 ppm. Para determinar el pico y asegurar el análisis

cualitativo del analito, se comparó el tiempo de retención en la muestra fortificada y una muestra blanco.

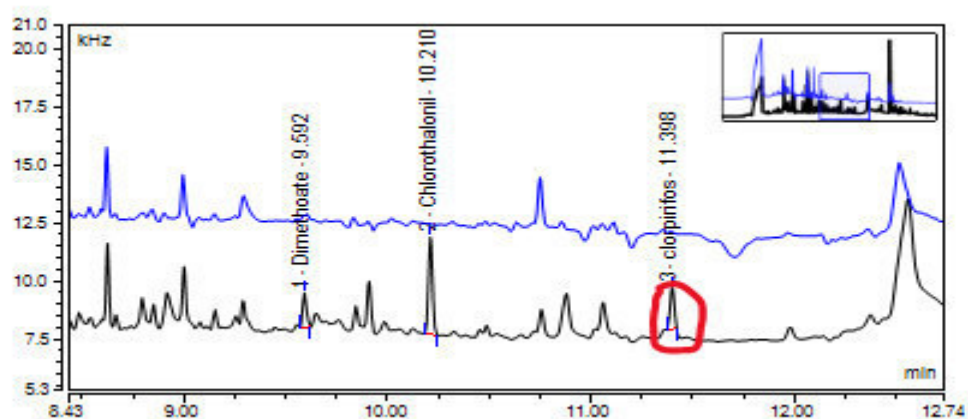


Figura N°23. Selectividad del plaguicida clorpirifos. (Blanco: color azul, fortificado: color negro).

- Determinación de la linealidad de la curva de calibración

A continuación, se presenta la representación gráfica de la recta de calibración obtenida.

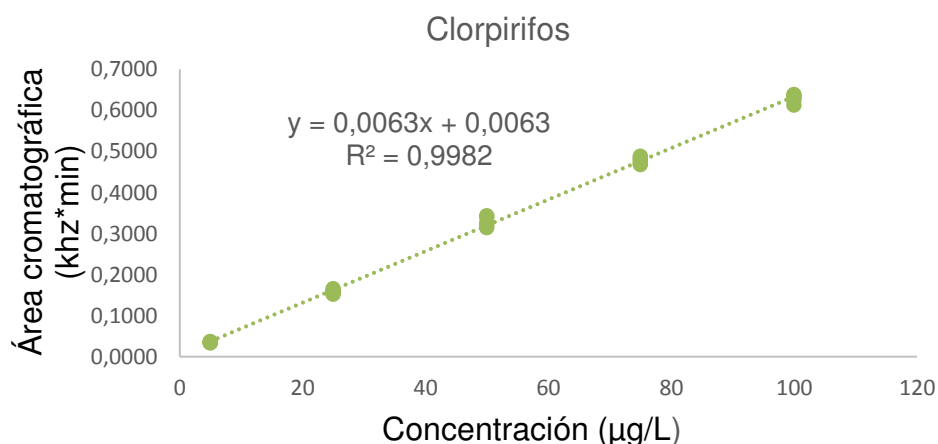


Figura N°24. Curva de calibración del estándar de plaguicida Clorpirifos.

En la Tabla N°12 se presentan las áreas cromatográficas para la elaboración de la curva de calibración del plaguicida clorpirifos

Tabla N°12. Áreas cromatográficas de la curva de calibración del clorpirifos.

Concentración (ppb)	Áreas cromatográficas Khz*min					Promedio (Khz*min)	S	CV
5	0.0371	0.0353	0.0354	0.0363	0.0340	0.0356	0.0011	3.27
25	0.1529	0.1563	0.1603	0.1605	0.1657	0.1591	0.0048	3.03
50	0.3148	0.3220	0.3251	0.3403	0.3435	0.3291	0.0122	3.73
75	0.4839	0.4729	0.4684	0.4792	0.4889	0.4786	0.0082	1.71
100	0.6358	0.6261	0.6128	0.6386	0.6325	0.6291	0.0102	1.63

S: desviación estándar, RSD: desviación estándar relativa.

Para dar mayor validez a la prueba de rango lineal de la curva de calibrado, se necesita elaborar una prueba estadística, el estimador estadístico fue la prueba t, asumimos que la hipótesis nula H_0 es cero, es decir, no existe relación alguna entre el área cromatográfica y la concentración, la hipótesis alterna H_1 se basa en que si existe correlación entre variables; en otras palabras si encontramos que el

valor de t calculado es mayor que el tabulado, rechazaremos la H_0 y concluirá que si existe correlación.

Para esta prueba se estima con n-2 g.l, esto nos brinda un nivel de confianza de 0.05. En la Tabla N°13 se presenta los resultados de la prueba t.

$$t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0 \quad (54)$$

Dónde:

n= número puntos de la curva.

r y R^2 : datos de la regresión lineal.

Tabla N°13. Resultados del t de student para la prueba de linealidad.

Plaguicida	R	r ²	t(tab)	t calculado	Ho	H1
Clorpirifos	0.9991	0.9982	3.18	40.788	Se rechaza	Significativa

➤ Resultados de la evaluación de la exactitud

Dicho parámetro se estimó calculando los porcentajes de recuperación en 5 fortificaciones en 3 niveles de concentración distintos y se halló sus coeficientes de variación. Los datos hallados se muestran en la Tabla N°14.

Tabla N°14. Resultados de la evaluación del parámetro de la exactitud.

Plaguicida	Concentración Teórica (ppm)	Área cromatográfica Std (min*kHz)	Área fortificada (min*kHz)	Promedio Área de Fortificado (min*kHz)	Porcentaje de recuperación (%)	RSD	t tab	t ob
Clorpirifos	0.025	0.1844	0.203	0.1878	101.84	4.84	2.776	0.00157
			0.185					
			0.184					
			0.179					
			0.188					
	0.05	0.3524	0.340	0.3562	101.07	7.09	2.776	0.0012
			0.333					
			0.354					
			0.398					
			0.356					
	0.1	0.6135	0.631	0.6408	104.44	2.48	2.776	0.02461
			0.647					
			0.652					
			0.618					
			0.656					

RSD: desviación estándar relativa.

Para verificar si el parámetro se evaluó de forma correcta, se determinó un test de hipótesis con un nivel de confianza del 95 % para las 3 concentraciones, y las hipótesis fueron:

$$H_0: \mu_{\%R} = 100 \%$$

$$H_1: \mu_{\%R} \neq 100 \%$$

Se halló el valor T experimental, tomando en cuenta la siguiente ecuación matemática

$$t_{exp} = \frac{|\mu - 100\%| \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (54)$$

Donde 100 % es el valor verdadero esperado, μ es la recuperación media, S es la desviación estándar y n es el número de repeticiones.

Los resultados obtenidos en la Tabla N°10, muestra que la recuperación del analito clorpirifos fue estadísticamente del 100 %.

➤ Resultados de la evaluación de la precisión

Respecto a la evaluación del parámetro de la precisión se evaluó de 2 maneras en términos de repetitividad y reproducibilidad en la Tabla N°15

Tabla N°15. Resultados de la evaluación del parámetro de la precisión.

Día	Plaguicida	Concentración (µg/L)	AC Std	Fortificado	Promedio	S	RSD (%)	Varianza
Día 1 Repetitividad		0.025	0.1844	0.203	0.1878	0.009	4.842	8.00E-05
				0.185				
				0.184				
				0.179				
				0.188				
				0.34				
	Clorpirifos	0.05	0.3524	0.333	0.3562	0.025	7.092	0.0006
				0.354				
				0.398				
				0.356				
				0.631				
				0.647				
		0.1	0.6135	0.652	0.6408	0.015	2.481	0.0003
				0.618				
				0.656				
				0.191				
				0.18				
				0.193				
Día 2 Reproducibilidad		0.025	0.1996	0.184	0.1874	0.005	2.839	3.00E-05
				0.189				
				0.309				
				0.371				
				0.34				
				0.291				
	Clorpirifos	0.05	0.3451	0.303	0.3228	0.032	10.05	0.0011
				0.701				
				0.72				
				0.703				
				0.724				
				0.684				
		0.1	0.7145	0.703	0.7064	0.016	2.28	0.0003
				0.724				
				0.684				
				0.701				
				0.72				
				0.703				

RSD: desviación estándar relativa

S: desviación estándar

AC: Área cromatográfica

Los resultados demuestran que la precisión evaluada según la repetitividad y reproducibilidad expresada en RSD fue menor al 20 %. El análisis estadístico que se realizó para comprobar la precisión del método fue la igualdad de varianzas,

utilizando la prueba de Fisher. Se dice que las varianzas de los resultados son iguales cuando:

$$F \text{ calculado} < F \text{ crítico}$$

Dónde:

$$F \text{ calculado: Varianza mayor / varianza menor.}^{(54)}$$

F crítico es hallado en Tabla con un α (nivel de confianza de 95%)

En la Tabla N°16 se presenta los resultados de los resultados estadísticos para las 3 concentraciones (0.025, 0,05 y 0.1 ppm)

Tabla N°16. Resultados de análisis estadístico de la precisión.

F calculo (0.025)	F calculo (0.05 ppm)	F calculo (0.1 ppm)	F critico (tabla)
2.922	1.65	1.026	6.388

De la Tabla N°16, se observa que los F calculados para las 3 concentraciones, son menor que el F crítico por lo que se concluye que las varianzas no son significativamente diferentes, por lo que se demuestra que el método es preciso.

A manera de resumen en las Figuras N° 25 y 26 se presentan los resultados de la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud.

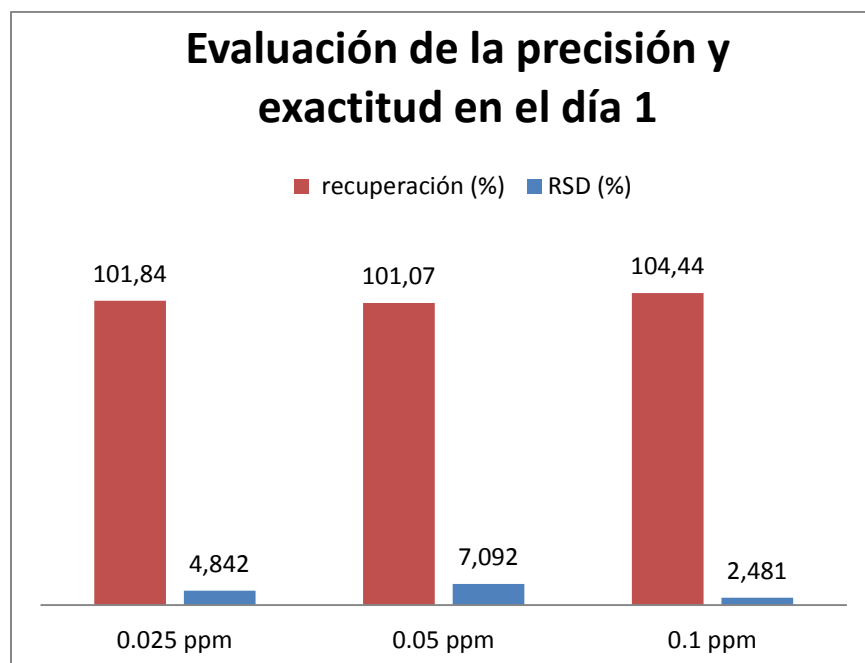


Figura N°25. Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud día 1

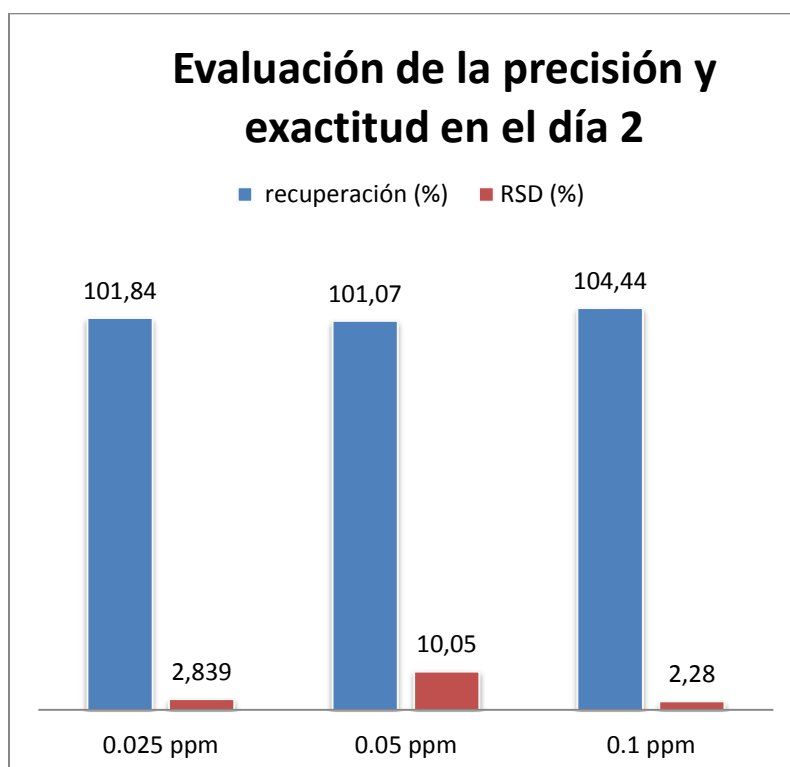


Figura N°26. Resultados de la evaluación de la precisión y exactitud día 2

➤ Determinación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

Elaborada la curva de calibración del plaguicida clorpirifos, se determinó los límites de detección y cuantificación utilizando la curva de calibración. En este caso se utilizó como blanco el intercepto. En la Tabla N°17 se presenta los resultados obtenidos para el plaguicida clorpirifos

Tabla N°17.Resultados de la evaluación de los límites de cuantificación y detección.

Plaguicida	Coef. correlación (R ²)	S blanco	Pendiente curva (b)	LD (mg/kg)	LC (mg/kg)
Clorpirifos	0.9982	0.001281	0.0063	0.002	0.005

S: desviación estándar

V. DISCUSIÓN

Se determinó la aprobación de 12 muestras con LMRs, dictados para semillas de quinua por Codex Alimentarius, la Unión Europea, Canadá, los Estados Unidos, y por la legislación peruana.

Todas las muestras analizadas contienen residuos del plaguicida clorpirifos en el presente experimento, a nivel de trazas; en la actualidad se cuenta con pocos estudios que confirmen que exposiciones a este compuesto puedan originar cáncer en seres humanos en un largo período. De cualquier modo, está confirmada su toxicidad aguda a nivel del sistema nervioso, inclusive puede producir la muerte si se expone a grandes cantidades. Según los datos expuestos en la Tabla N°11, de las 12 muestras, todas presentaron residuos del plaguicida clorpirifos, sin embargo, solo la muestra M5 (0.136 mg/kg) sobrepasa los límites máximos permitidos por todas las entidades como Canadá (0.1 mg/kg), Unión Europea (0.05 mg/kg) y el Perú (0.05 mg/kg). Para el caso de los Estados Unidos como se mencionó con anterioridad, dicho país no permite el ingreso de quinua con presencia del plaguicida clorpirifos a cualquier nivel, por ello no es aconsejable exportar quinua a dicha concentración por lo que se recomienda es exportar a otro destino donde exista LMR para el clorpirifos en quinua o exponer la quinua a altas temperaturas y luz para que las concentraciones disminuyan significativamente. En otro punto, el tiempo de vida media del plaguicida clorpirifos es variable. Puede ser corto, y por otro lado se puede observar que puede llegar a ser muy persistente en el suelo y/o planta. Las cantidades halladas se encuentran a nivel de trazas (por debajo de los 0.1 mg/kg), tal y como se presentan en la

Tabla N°11, no obstante, es muy probable que se presente una bioacumulación lo cual conllevaría a un aumento gradual de la concentración de dicho plaguicida. Convirtiéndose en un peligro para la salud de las personas.

Los resultados encontrados son muy similares a lo reportado por Zirena (2010) ⁽⁷⁾ el cual halló residuos de plaguicidas (entre ellos al clorpirifos) en quinua por LC-MS/MS a concentraciones por debajo de los 0.01 mg/kg, dichos resultados fueron encontrados en quinua orgánica en el departamento de Puno, lo sorprendente es que dicha producción declaró no utilizar dichos productos químicos.

Así mismo Ortega et al (2012) ⁽⁸⁾ en su trabajo de investigación para analizar organoclorados en quinua por GC-ECD, de igual manera encontró residuos de dichos plaguicidas a concentraciones de 0.005 mg/kg lo cual muestra una clara residualidad por parte de los plaguicidas en el cultivo de quinua.

Finalmente el trabajo de investigación realizado por Senasa en el 2014 ⁽⁹⁾ también presenta similitud con nuestro trabajo de investigación, debido a que en dicha investigación reportó concentraciones de plaguicidas a nivel de ppb o ppm en quinua cosechada lista para consumo o para exportar.

Con los resultados encontrados, se puede hacer énfasis en lo indispensable, que significa contar con una norma que verifique las concentraciones de los plaguicidas en los cultivos. Ya que como se aprecia, aún se observa la

residualidad del plaguicida clorpirifos aún en el período de cosecha lo cual puede ser perjudicial para la salud y para su exportación.

Las condiciones cromatográficas fueron las óptimas para la identificación y posterior cuantificación del plaguicida organofosforado clorpirifos en semillas de quinua, tomando en cuenta su respuesta cromatográfica a varios factores como: temperatura de columna, temperatura de inyector y detector, flujo de fase móvil (Helio), volumen de inyección, entre otros. Llegando a obtener una buena respuesta cromatográfica tal y como se detalla en la Figura N°22.

La matriz (quinua molida), podría contener interferentes que pueden influenciar en la identificación y cuantificación del plaguicida clorpirifos; aumentando o disminuyendo la señal visualizado en el cromatógrafo de gases. Con la finalidad de poder evaluar la afirmación anterior mencionada se fortificó un blanco con una concentración conocida y se identificó el plaguicida deseado, tal y como se muestra en la Figura N°6. Por lo que se observa que el método es selectivo para el plaguicida clorpirifos en la matriz de quinua. Además, no se evidencia interferente alguno en el mismo tiempo de retención que el plaguicida en mención.

Revisando los resultados mostrados en la Figura N°24, el plaguicida clorpirifos presenta un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9982, el cual es mayor al dispuesto por la AOAC (2002) ⁽⁵⁵⁾, así mismo se realizó el análisis estadístico de la regresión lineal mediante t- student y se observa que existe una relación entre la concentración del plaguicida clorpirifos y el área cromatográfica. Resultados similares obtuvo Mosquera (2012) ⁽⁵⁶⁾ y Ortega et al. (2012) ⁽⁸⁾ respecto al

coeficiente de correlación para muestras de suelos y quinua respectivamente. El coeficiente correlación para clorpirifos en suelos realizado por Mosquera (2012), fue 0.997 utilizando como técnica de identificación a la cromatografía gaseosa con detector a la Flama (GC-FID), en el caso de la investigación en quinua, el plaguicida clorpirifos obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9908 y su identificación fue realizada por HPLC-MS/MS. Se concluye que los resultados obtenidos en el análisis realizado en la matriz quinua, se encuentra dentro de los estándares en comparación con otras investigaciones. Esto debido a las precauciones que se tuvo en cuenta al momento de realizar las diluciones de los patrones analíticos como por ejemplo errores sistemáticos, material debidamente lavado, solventes de alta pureza (HPLC), entre otros.

Como parte de la validación del método propuesto, se realizó un estudio de recuperación del plaguicida clorpirifos para evaluar el parámetro de la exactitud, a tres niveles de concentración 0.025, 0.05 y 0.1 mg/L en semillas de quinua obtenidos de una producción orgánica (libre de plaguicidas). El estudio se realizó por quintuplicado para cada muestra. Los resultados se presentan en la Tabla N°14. Los porcentajes de recuperación obtenidos para el clorpirifos se encuentra en el rango comprendido entre 94 – 106.6 %.Respecto a la precisión en la Tabla N°15 se presenta los resultados de determinación de clorpirifos mediante GC-ECD, la repetitividad expresada como RSD, evaluada a los tres niveles de concentración fue 7.09 %, de la reproducibilidad, también expresada como RSD, evaluada en los mismos niveles de concentración en día y por analista diferente obtuvo un valor de 10.05 % ambos valores de RSD se encuentro dentro de lo

establecido por la Comisión Europea la cual estable como un máximo de 20 % de RSD.⁽⁵¹⁾ Los altos porcentajes de recuperación y una desviación estándar relativa menor al 20 % demuestran que la metodología desarrollada presenta una adecuada precisión y exactitud. Ambos parámetros cumplen los criterios establecidos por la Unión Europea para la evaluación de técnicas analíticas empleados en el análisis de residualidad de plaguicidas en alimentos de origen vegetal y animal, la recuperación medida en porcentaje (%) se encuentra entre 70 – 120 % y la desviación estándar relativa menor al 20 %.⁽⁵¹⁾ Resultados similares obtuvo Zirena et al. (2010)⁽⁷⁾ en su trabajo de investigación. Donde obtuvo un porcentaje de recuperación para el plaguicida clorpirifos del 88.87 % y con una desviación estándar menor al 20 % en matriz de quinua y con la técnica de identificación por HPLC MS/MS. Otro trabajo de investigación realizado por Mosquera (2010) sobre el análisis de clorpirifos en suelos utilizando la técnica de GC-FID, obtuvo un porcentaje de recuperación 78 %, con un RSD del 2.7 %. Resultados similares obtuvo Chandra *et.al*,⁽⁵⁷⁾ en su trabajo de investigación sobre análisis de clorpirifos y cipermetrina en berenjena y coliflor utilizando GC-ECD obtuvo porcentajes de recuperación para el plaguicida clorpirifos de 90.05 % con un RSD máximo de 4.48 % por lo que concluye que no existió interferencia por parte de la matriz.

Tomando en cuenta esta información, la matriz de quinua no presentó efecto matriz debido a los óptimos resultados en veracidad y su coeficiente de variación relativa dentro de los criterios establecidos por la Comisión Europea.

Elaborada la preparación de los patrones analíticos y su posterior inyección al GC-ECD, en las concentraciones de 5, 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g/L}$. Así fue determinado el estudio de la linealidad, para el cálculo de los LD y LC fue necesario los valores de la ecuación de la curva de calibración, para lo cual fue considerado la pendiente de la recta (b), del mismo modo se utilizó la desviación estándar del blanco (intercepto). En la Tabla N°17 se presentan los resultados obtenidos, donde los límites de detección y cuantificación fueron de 0.002 y 0.0054 mg/kg. Zirena ⁽⁷⁾ en su trabajo de investigación en quinua obtuvo límites de detección y cuantificación de 0.135 y 0.408 $\mu\text{g/L}$ para el plaguicida clorpirifos. Por otro lado, Mosquera ⁽⁵⁶⁾, en su trabajo de investigación en suelos obtuvo límites de detección y cuantificación de 0.25 y 3 mg/L para el plaguicida clorpirifos. Chandra *et.al* ⁽⁵⁷⁾, en su trabajo de investigación en vegetales (coliflor y berenjena) obtuvo límites de detección y cuantificación de 0.005 y 0.02 $\mu\text{g/L}$ para el plaguicida clorpirifos. Sin duda alguna el factor más importante para lograr óptimos límites de detección es el tipo de instrumentación utilizando en cada uno de los trabajos de investigación mencionados en especial aquellos que utilizaron como detector un espectrómetro de masas. Se muestra que en nuestro trabajo de investigación utilizando el detector de captura de electrones (ECD) cumple las expectativas analíticas en comparación con otras investigaciones y sobre todo que el límite de cuantificación se encuentra muy por debajo de los LMR establecidos por las entidades internacionales y nacionales.

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos confirman la presencia del plaguicida clorpirifos en todas las muestras de semillas de quinua en el período de cosecha.
- La concentración del plaguicida clorpirifos en semillas de quinua tiene una media de 0.033 mg/kg (ppm)
- Se demostró que el 91.7 % de las muestras, presentan residuos del plaguicida clorpirifos, sin embargo, dichas concentraciones no sobrepasan significativamente el LMR exigido por nuestro país y la Unión Europea (0.05 mg/kg). De igual forma se reportó que solo el 8.3 % presentan residuos del plaguicida clorpirifos, a una concentración media de 0.136 mg/kg, la cual sobrepasa significativamente el LMR establecido por nuestro país y Unión Europea.

VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar análisis de plaguicida clorpirifos en suelos para observar si presenta niveles significativos de dicho plaguicida y observar si influye en la concentración en el cultivo.
- Se recomienda realizar análisis de otros plaguicidas como fungicidas e insecticidas, utilizando metodología validada.
- Hacer de conocimiento a los agricultores, que plaguicidas pueden ser aplicados en la producción de quinua en caso de exportación a otros países.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez-Jubete L, Arendt EK, Gallagher E. Nutritive value and chemical composition of pseudocereals as gluten-free ingredients. *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60(SUPPL.4):240–57.
2. Comisión de Promoción del Perú para la Exportación. PROMPERU [Internet]. LMR Plaguicidas. 2018 [citado 4 de enero 2018]. Disponible en: <http://plaguicidaslmr.promperu.gob.pe/Front/Plaguicidas>
3. Arquimbau EP. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plaguicidas organofosforados y organoclorados en muestras biológicas humanas Tesis Doctoral Elena Pitarch Arquimbau 2001. 2001; Disponible en: <http://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/10403/pitarch.pdf?sequence=1>
4. Botero AM. Aplicaciones de lc-ms/ms en la determinación de residuos de plaguicidas y drogas de abuso en muestras de latinoamérica. énfasis en la problemática analítica del glifosato. 2016;471.
5. Strada J. Evaluación del nivel de residuos de plaguicidas en granos de cereales y oleaginosas aplicados en el campo y en almacenamiento en la región central de Argentina. 2014;1–3. Available from: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/1523>
6. Páez MI, Martínez JM. Implementación de la metodología QuEChERS en el análisis de residuos de plaguicidas en maíz blanco (Zea mays)
Implementation of the methodology QuEChERS in the residual pesticide analysis in white corn (Zea mays). 2015;20(100).

7. Zirena Franz. Evaluación del método QuEChERS para cuantificación de agrotoxicos en quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). [Tesis de Maestría]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano. 2012;
8. Ortega Barriga RE, Zamalloa Cuba WA, Luiz Tornisielo V, Zirena Vilca F. Determination of organochlorine pesticides in organic quinoa grains (*Chenopodium quinoa* Willd.) by GC- μ ECD, using the QuEChERS method. Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res. 2016;18(1):19.
9. Servicio Nacional de Sanidad Agraria - SENASA. Informe del Monitoreo de Residuos Químicos y Otros Contaminantes en Quinua, Año 2014. [Internet]. 2014 [Citado 22 noviembre del 2017]. Disponible en : <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/commodities/details.html?id=646>.
10. Mujica S.A, Izquierdo J, Marathee J.P. QUINUA (*Chenopodium quinoa* Willd.) Ancestral cultivo andino, alimento del presente y futuro FAO. Cultivos Andinos. 2001;
11. Repo-Carrasco R, Espinoza C, Jacobsen S-E. Nutritional Value and Use of the Andean Crops Quinoa (*Chenopodium quinoa*) and Kañiwa (*Chenopodium pallidicaule*) . Food Rev Int. 2003;19(1-2):179-89.
12. MINAGRI. Boletín PERFIL TÉCNICO N2 La quinua: Producción y Comercio del Perú. Anexos [Internet]. 2017;1-8. Disponible en: <http://www.quinuainternacional.org.bo>
13. Environmental Protection Agency (EPA). The Agricultural Worker Protection Standard-Definition of Pesticide Handler. 2010 [citado 10 diciembre del 2017];

Available from: <https://www.epa.gov/agriculture/factsheets/epa-305-f-98-029.pdf>.

14. Organización Mundial de la Salud (OMS). Plaguicidas inhibidores de la colinesterasa: organofosforados y carbamatos [Internet]. 2010 [Citado el 17 Noviembre del 2017]. Disponible en: https://cursos.campusvirtualsp.org/pluginfile.php/377805/mod_resource/content/1/unidad4.pdf
15. Ramírez JA, Lacasaña Y. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición Pesticides: Classification, uses, toxicological aspects and exposure assesment. Arch Prev Riesgos Labor. 2001;4(2):67–75.
16. Jeffrey R. Bloomquist. Insecticides: Chemistries and Characteristics - University of Minnesota [Internet]. 2009 [citado 3 enero del 2018]. Disponible en : <https://ipmworld.umn.edu/bloomquist-insecticides>
17. Iwashita Y, Kamijo Y, Nakahashi S, Shindo A, Yokoyama K, Yamamoto A, et al. Selected Topics : Toxicology. J Emerg Med [Internet]. 2013;44(5):943–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jemermed.2012.11.026>
18. Carmona MD. Los organofosforados. Académico Número la Real Acad Nac Farm. :311–429.
19. Picco E. Influencia de los estados fisiologicos en la disposicion cinetica de clorpirifos en bovinos. 2009;241.Disponible en: <http://web10.unl.edu.ar:8080/tesis/xmlui/bitstream/handle/11185/144/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
20. Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, Aguilar-Garduño C, Blanco-Muñoz J, Pérez-Méndez O, et al. Association between

- organophosphate pesticides exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2010 [citado 13 febrero 2018]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19914268>
21. Jane S, Ross M, Ray C, Valerie H, Eugene C, Abraham-smith KM, et al. Neuropsychological and psychiatric functioning in sheep farmers exposed to low levels of organophosphate pesticides. *Neurotoxicol Teratol* [Internet]. 2010;32:452–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2010.03.004>
 22. Harris CR. Manual de toxicología para médicos. Mosby; 2008.
 23. A DGF, Mancipe LC, Diana G. Fernández. Intoxicacion por OP.pdf. Univ Pedagógica y Tecnológica Colomb UPTC. 2010;18(49):84–92.
 24. Muñoz F. Estudio de la afinidad entre la materia orgánica disuelta en las aguas naturales y clorpirifos. [Tesis de pregrado. Santiago], Chile. Universidad Nacional de Chile; 2014.
 25. Watts M. Watts Clorpirifos posible COP. 2012;1–46.
 26. Organization. WHO Specifications and evaluations for public health pesticides (Chlorpyrifos). *World Heal Organ* [Internet]. 2009;28(6):37. Disponible en: www.who.int/whopes/quality/Chlorpyrifos_WHO_specs_eval_Mar_2009.pdf
%0Ahttp://www.who.int/whopes/quality/en/
 27. ATSDR. Toxicological Profile for Chlorpyrifos. *Toxicol Profiles* [Internet]. 1997;(Septiembre). Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/TP.asp?id=495&tid=88>
 28. Márquez S., Mosquera R. HM. Estudio de la absorción y distribución del clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst ex chiov.) cultivadas hidropónicamente | Márquez Girón | Revista Colombiana de

Ciencias Pecuarias [Internet]. 2010 [citado 26 enero 2018]. Disponible:
<https://aprendeonlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/rccp/article/view/324558/20781774>

29. Mendieta C, Ortega N, Solano N, Figueroa J. Metodología para la Determinación de Plaguicidas Organoclorados mediante Cromatografía de Gases Acoplado Espectrometría de Masas y Detector de Captura de Electrones Development of a Method for the Quantification of Organochlorine Pesticides by GC-ECD-MS. Rev Politécnica. 2017;40(1).
30. Mackay D. Multimedia environmental models: the fugacity approach. CRC press. 2001.
31. Environmental Protection Agency (EPA). Revises chlorpyrifos preliminary registration review drinking waters assessment. 2011 [citado 23 marzo 2018];Availablefrom:https://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/chlorpyrifos/index/index.htm.
32. Sanja LAZIĆ , Dragana ŠUNJKA, Nada GRAHOVAC, Slavica VUKOVIĆ , Snežana JAKŠIĆ 1 Determination of chlorpyrifos in water used for agricultural production. 2012;57(4):17–25.

Harris CR. Manual de toxicología para médicos. Mosby; 2008.

33. Giesy JP, Solomon KR, Coats JR, Dixon KR, Giddings JM, Kenaga EE. Chlorpyrifos: ecological risk assessment in North American aquatic environments. Rev Environ Contam Toxicol [Internet]. 1999 [citado 14 abril 2019]; 160:1–129. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16802478>

34. PPDB: Pesticide Properties DataBase. chlorpyrifos [Internet]. 2018 [citado 2 marzo del 2018].Available from:<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/154.htm>
35. López D. Determinación de residuos de plaguicidas en tomate riñón (*Lycopersicum esculentum*) por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas (GC-MSD). [Tesis de pregrado]. Ecuador: Universidad Pontificia Católica del Ecuador; 2012.
36. Trullo N. Aprueban Norma Sanitaria que establece los límites máximos de residuos (LMR) de plaguicidas de uso agrícola en alimentos de consumo humano.2016. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/11/RM-1006-2016-MINSA-con-NTS-128-MINSA-2016-DIGESA-LMR-Plaguicidas.pdf>
37. Liu S, Yuan L, Yue X, Zheng Z, Tang Z. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate Pesticide Detection. Adv Powder Technol [Internet]. 2008; 19(5):419–41. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0921-8831\(08\)60910-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-8831(08)60910-3)
38. Stoytcheva M, Zlatev R, Valdez B, Magnin JP, Velkova Z. Electrochemical sensor based on *Arthrobacter globiformis* for cholinesterase activity determination. Biosens Bioelectron. 2006; 22(1):1–9.
39. Marín López LF, Jaramillo Colorado B. Determinación de Contaminantes Organofosforados en Leche de Ganado Bovino y Suelos de Cultivo Provenientes del Municipio de San Bernando del Viento, Córdoba y Obtención de Cepas Bacterianas Nativas del Suelo con Capacidad Degradativa (Tesis de

- Maestría). 2014; 94.
40. Azuola, Rocio.; Vargas P. Extracción de sustancias asistida (EUA) por ultrasonido. *Tecnol en Marcha*. 2007; 20(4):11.
 41. Luque de Castro MD, García-Ayuso LE. Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Anal Chim Acta*. 1998; 369(1–2):1–10.
 42. Simpson NJK, Wells MJM. *Introduction To Solid-Phase. Group*. 2000;
 43. Simpson NJK. *Solid-phase extraction : principles, techniques, and applications* [Internet]. Marcel Dekker; 2000 [citado 23 mayo del 2018]. 514 p. Disponible en
[:https://books.google.com.pe/books?id=olcohx9gDdkC&pg=PA180&lpg=PA180&dq=Fritz+J.S.+Analytical+solid+phase+extraction.+Ed.+John+Wiley+%26+Sons,+l.+1999&source=bl&ots=g0rmDv6k3W&sig=ACfU3U1QNfB8bBLnYSy4OKwnXDo0wsRxmQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj3hsuG0YDjAhVBmVkk](https://books.google.com.pe/books?id=olcohx9gDdkC&pg=PA180&lpg=PA180&dq=Fritz+J.S.+Analytical+solid+phase+extraction.+Ed.+John+Wiley+%26+Sons,+l.+1999&source=bl&ots=g0rmDv6k3W&sig=ACfU3U1QNfB8bBLnYSy4OKwnXDo0wsRxmQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwj3hsuG0YDjAhVBmVkk)
 44. ZIEF M, KAKODKAR S V. *Solid Phase Extraction for Sample Preparation*. *Prog Pharm Biomed Anal* [Internet]. 1994 Jan 1 [citado 10 abril del 2018]; 1:127–4
 45. McNair Harold, Miller J. *Basic gas Basic Chromatography* 2 ed. 2009; 239.
 46. Grob RL, Barry EF. *Modern Practice of Gas Chromatography Modern Practice of Gas Chromatography*. John Wiley & Sons. 2004. 1036 p.
 47. Gonzalez Saavedra LS, Meneses Vanegas CM. *Determinación De La Característica De Toxicidad Del Ingrediente Activo “Clorpirifos” En El Plaguicida Organofosforado Attamix Sb Mediante El Procedimiento De TcIp*. 2008;

48. Grob K, Grob K. Split and splitless injection for quantitative gas chromatography: concepts, processes, practical guidelines, sources of error [Internet]. Wiley-VCH; 2001 [Citado 15 febrero del 2018]. 460 p. Disponible en: <https://www.wiley.com/enpe/Split+and+Splitless+Injection+for+Quantitative+Gas+Chromatography:+Concepts,+Processes,+Practical+Guidelines,+Sources+of+Error,+4th,+Completely+Revised+Edition-p-9783527612888>
49. Barry EF, Grob RL (Robert L. Columns for gas chromatography: performance and selection [Internet]. Wiley-Interscience; 2007 [citado 29 enero del 2019]. 298 p. Disponible en: <https://www.wiley.com/enpe/Columns+for+Gas+Chromatography:+Performance+and+Selection-p-9780470114179>
50. Skoog D. Fundamentos de química analítica. Barcelona: Paraninfo. 2011. 8° ed;
51. European Commission. SANTE Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. 2017; 42.
52. Fao E. De Calidad De Los Alimentos De Calidad De Los Alimentos En Laboratorios De Inspección Alimentaria.
53. GOOGLE Maps. Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA - Google Maps [Internet]. 2018 [citado el 4 de mayo 2018]. Disponible: <https://www.google.com.pe/maps/place/Instituto+Nacional+de+Innovación+Agraria++INIA/@12.075376876,9454875,168m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x9105c6e139896071:0x9363f8ac9e7acbbd!8m2!3d-12.0766751!4d-76.9452381>

54. Molina I. Metodología para la determinación de plaguicidas bencimidazoles en vinos. [Tesis de pregrado]. Mendoza: Universidad Nacional de Cuyo; 2012.
55. AOAC. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. J AOAC Int. 2002; 16:1–38.
56. Mosquera D. Estandarización de un método para la cuantificación de plaguicidas organoclorados y organofosforados en suelos por cromatografía de gases con detectores FID y ECD. [Tesis de pregrado]. Pereira – Colombia: Universidad Tecnológica de Pereira; 2012.
57. Chandra S, Mahindrakar AN, Shinde LP. Determination of cypermethrin and chlorpyrifos in vegetables by GC-ECD. Int J ChemTech Res. 2010; 2(2):908–11.

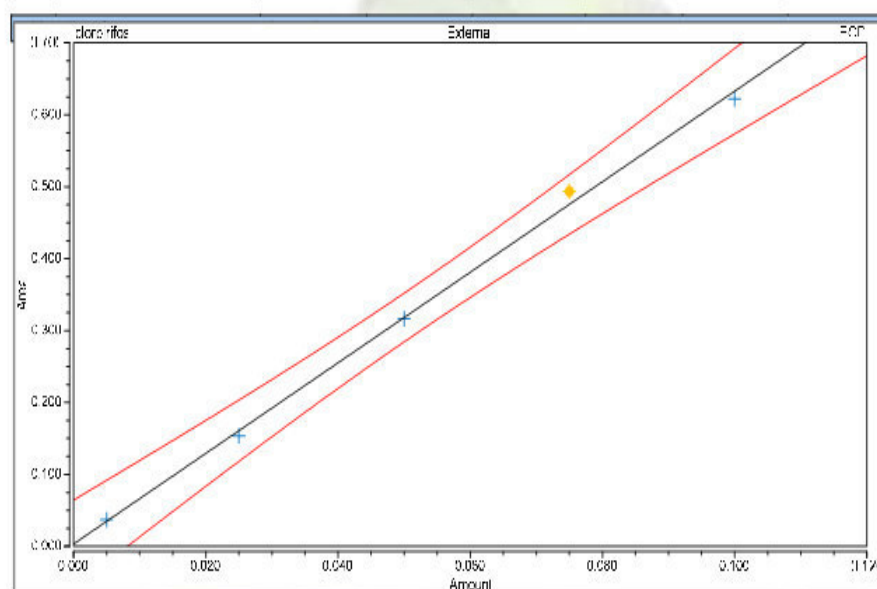
IX. ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración del plaguicida clorpirifos

Instrument: INIA-PC_1 Sequence: PClorados

Page 1 of 1

Calibration				
Calibration Details				
	clorpirifos			
Calibration Type	Lin, WithOffset	Offset (C0)	0.0036	
Evaluation Type	Area	Slope (C1)	8.2948	
Number of Calibration Points	5	Curve (C2)	0.0000	
Number of disabled Calibration Points	0	R	0.9978	

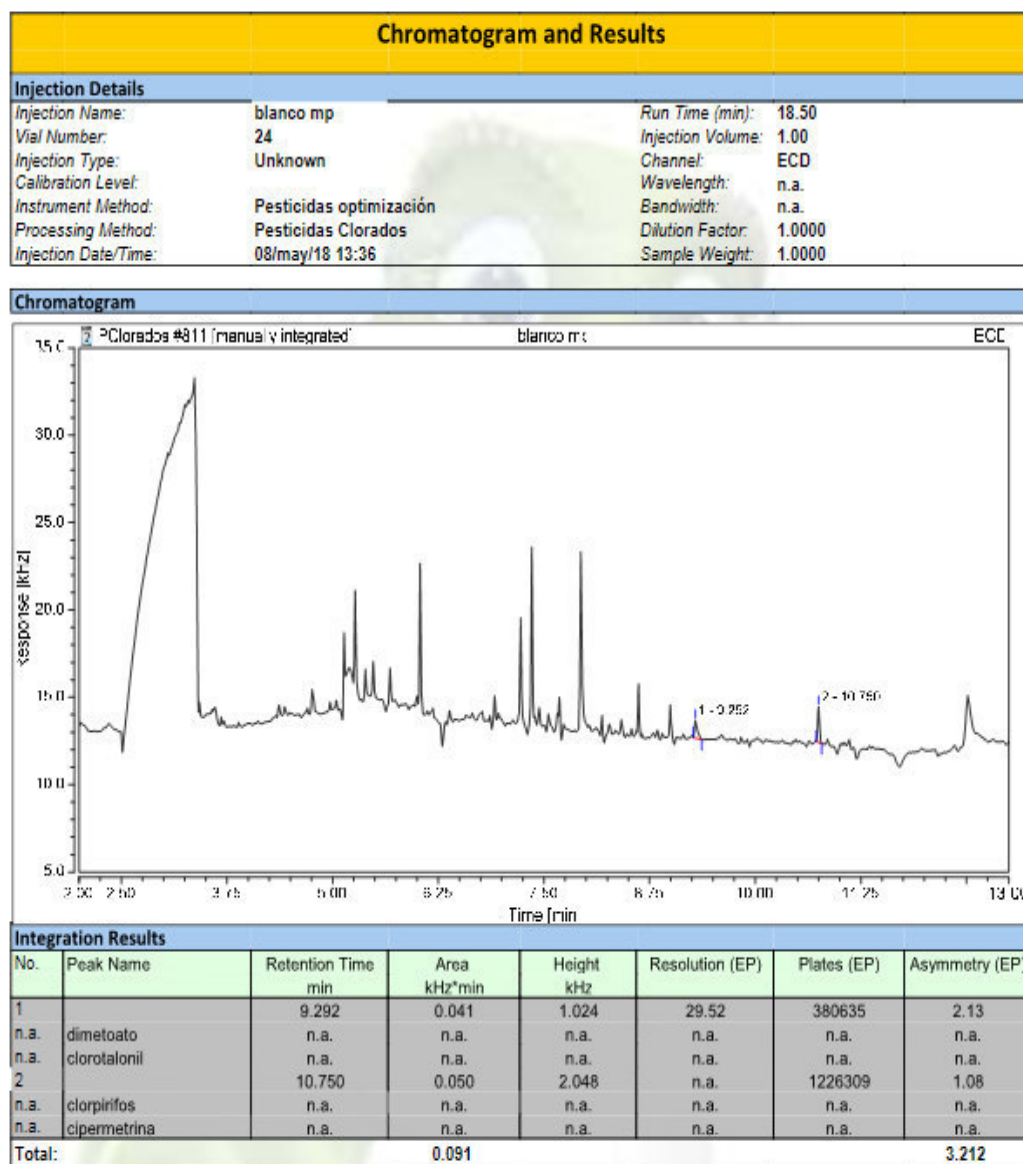


Calibration Results								
clorpirifos								
No.	Injection Name	Calibration Level	Retention (DETECT min)	Plates (EP)	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Y Value	Area
			clorpirifos	ECD clorpirifos	ECD clorpirifos	ECD clorpirifos	ECD clorpirifos	kHz*min ECD clorpirifos
690	Std 5ppb	1	11.42	942470	n.a.	1.07	0.0371	0.037
691	Std 25ppb	2	11.41	936727	n.a.	1.06	0.1536	0.154
692	Std 50ppb	3	11.41	893234	n.a.	1.00	0.3165	0.316
713	Std 100ppb	5	11.39	874293	n.a.	1.04	0.6222	0.622
717	Std 75ppb	4	11.40	864250	n.a.	1.00	0.4937	0.494

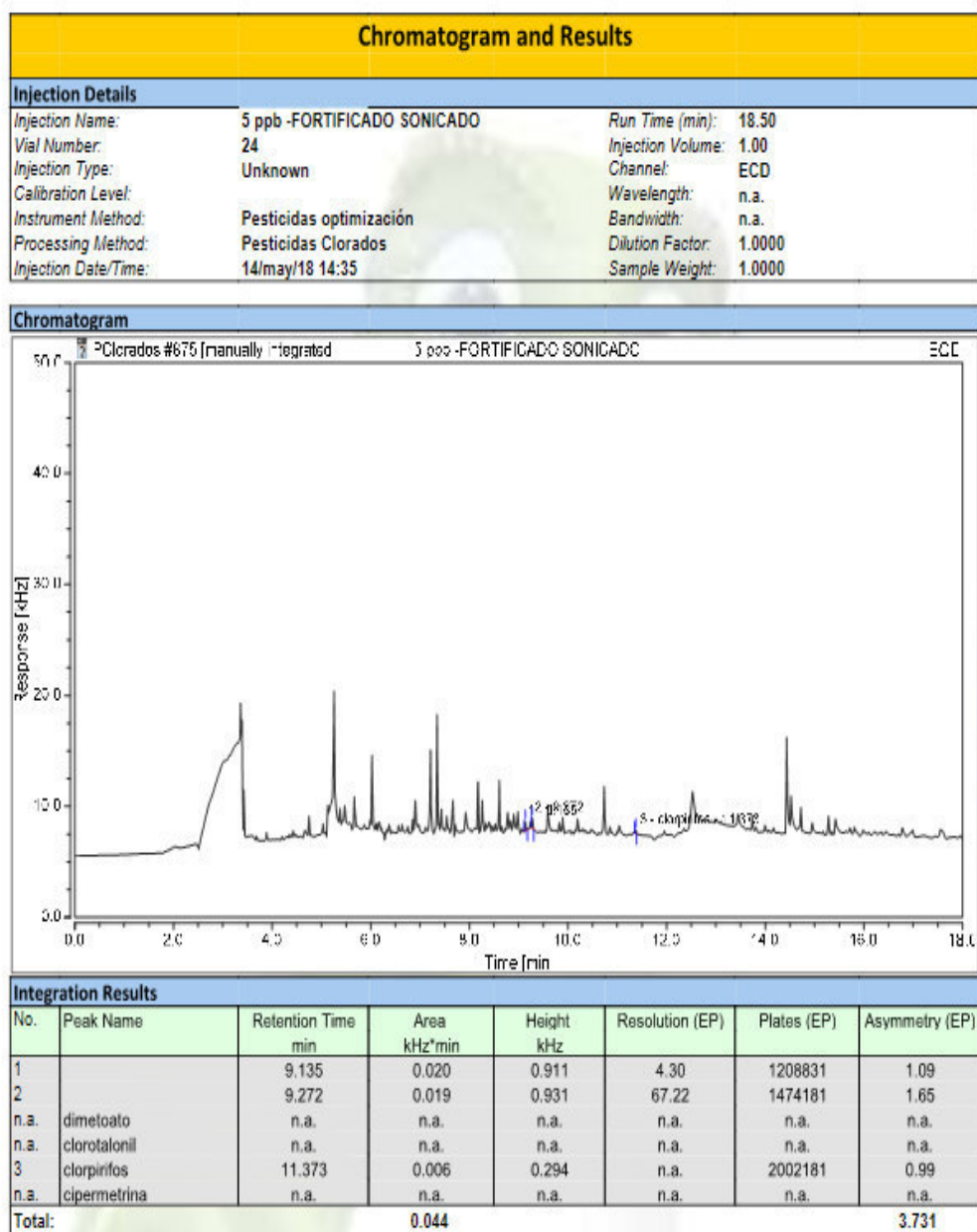
Anexo 2. Cromatograma de quinua libre del plaguicida clorpirifos (blanco)

Instrument: INIA-PC_1 Sequence: PClorados

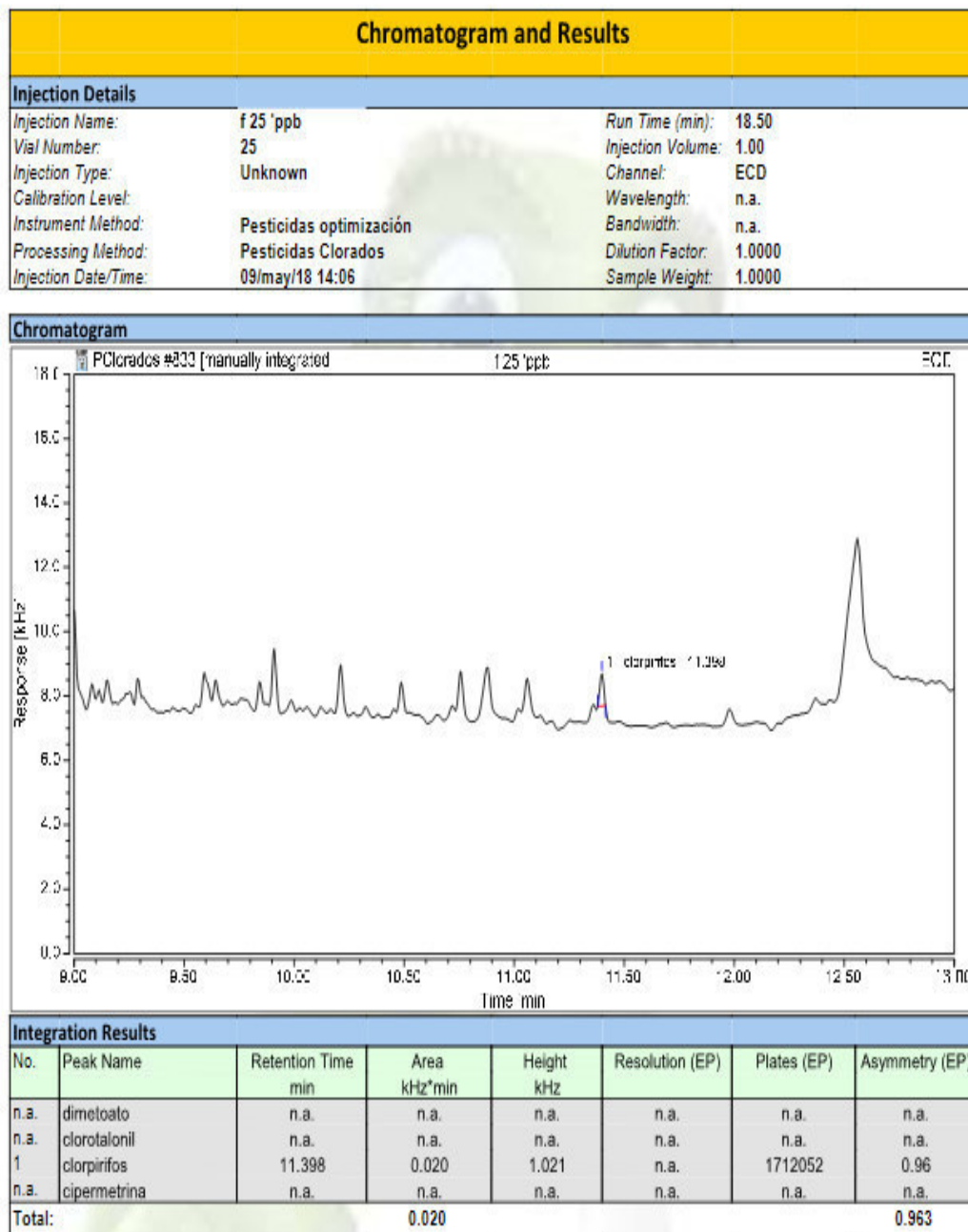
Page 1 of 1



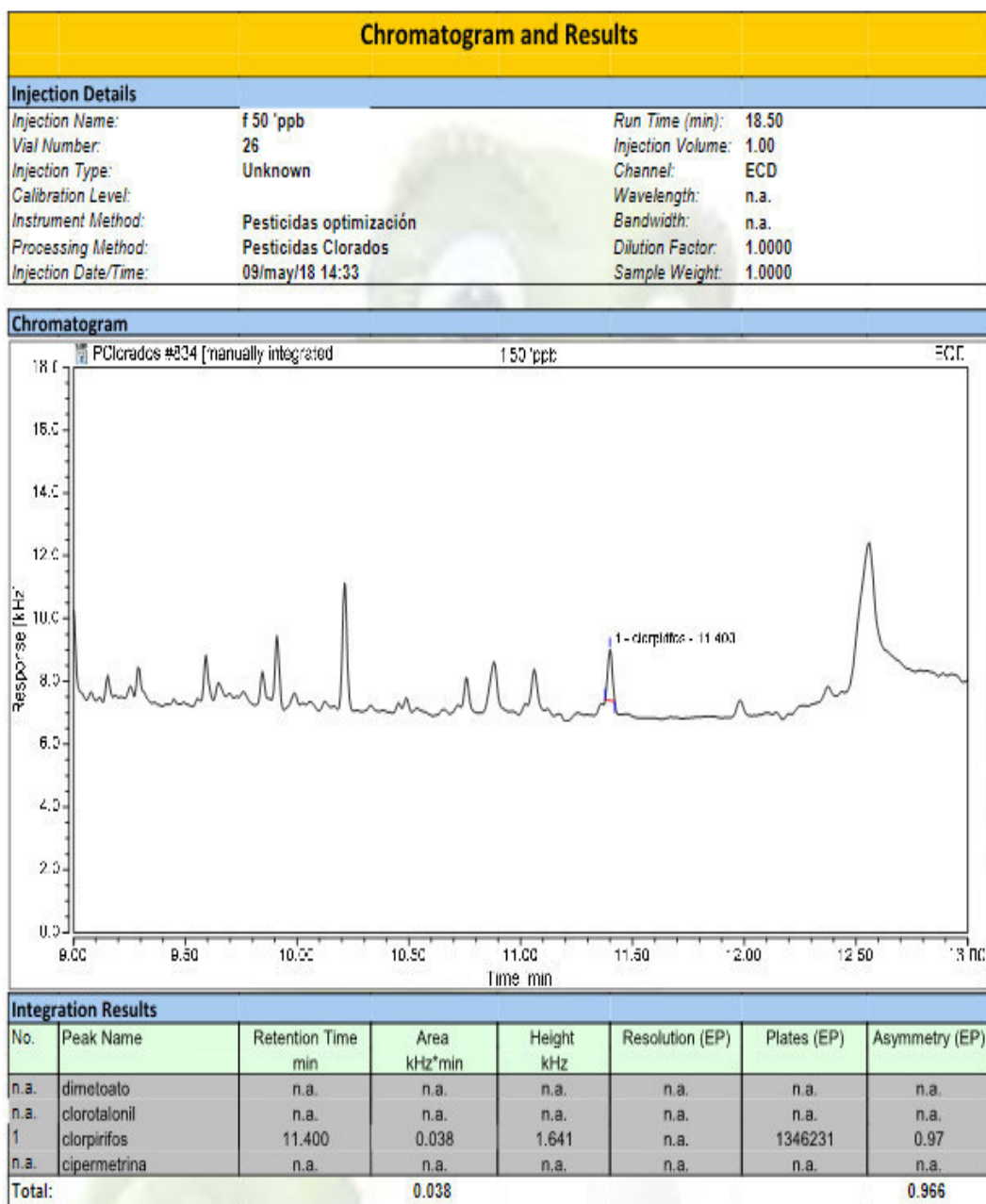
Anexo 3. Cromatograma de blanco fortificado con estándar del plaguicida clorpirifos (5 ppb)



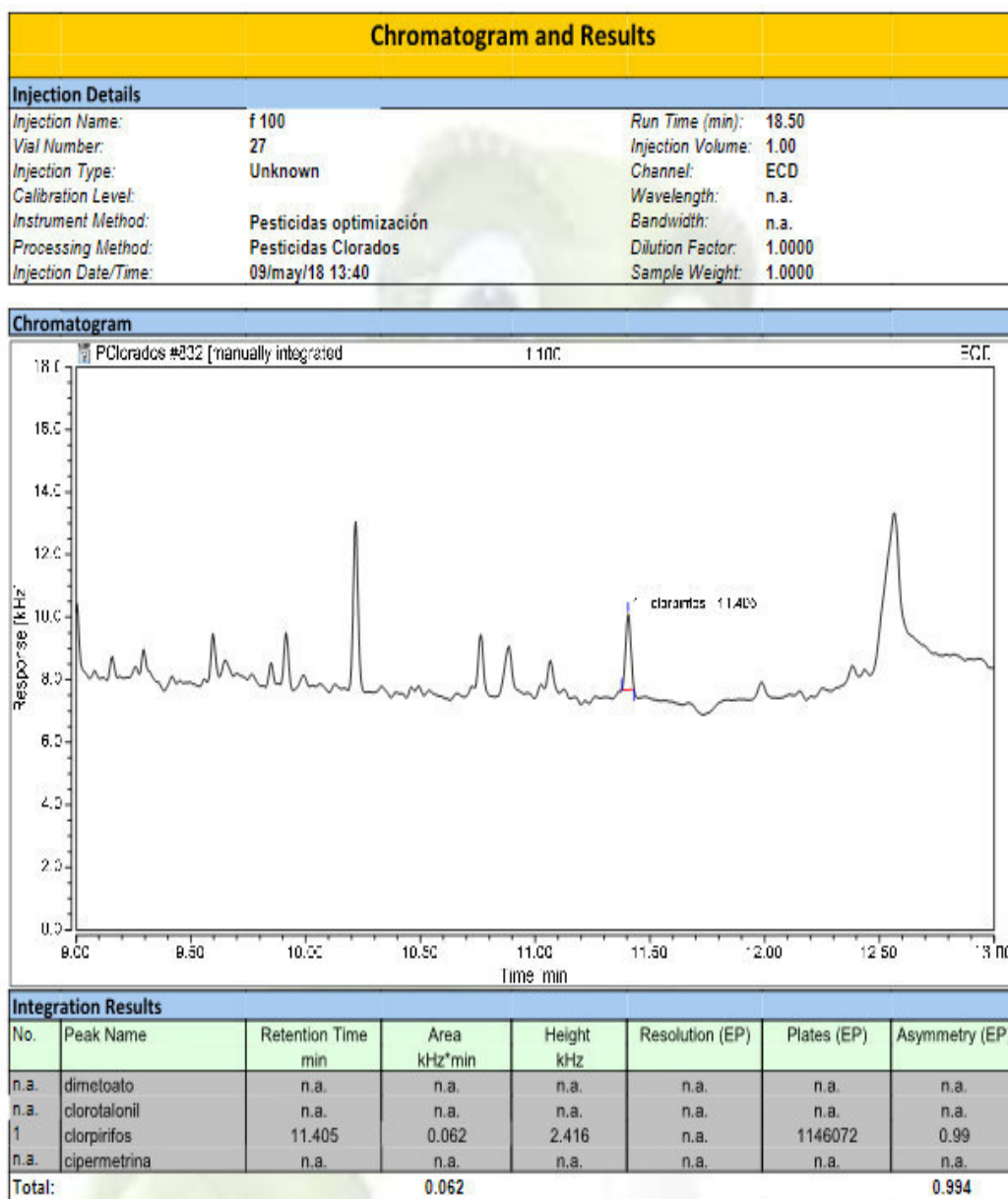
Anexo 4. Cromatograma de blanco fortificado con estándar de plaguicida clorpirifos 25 ppb



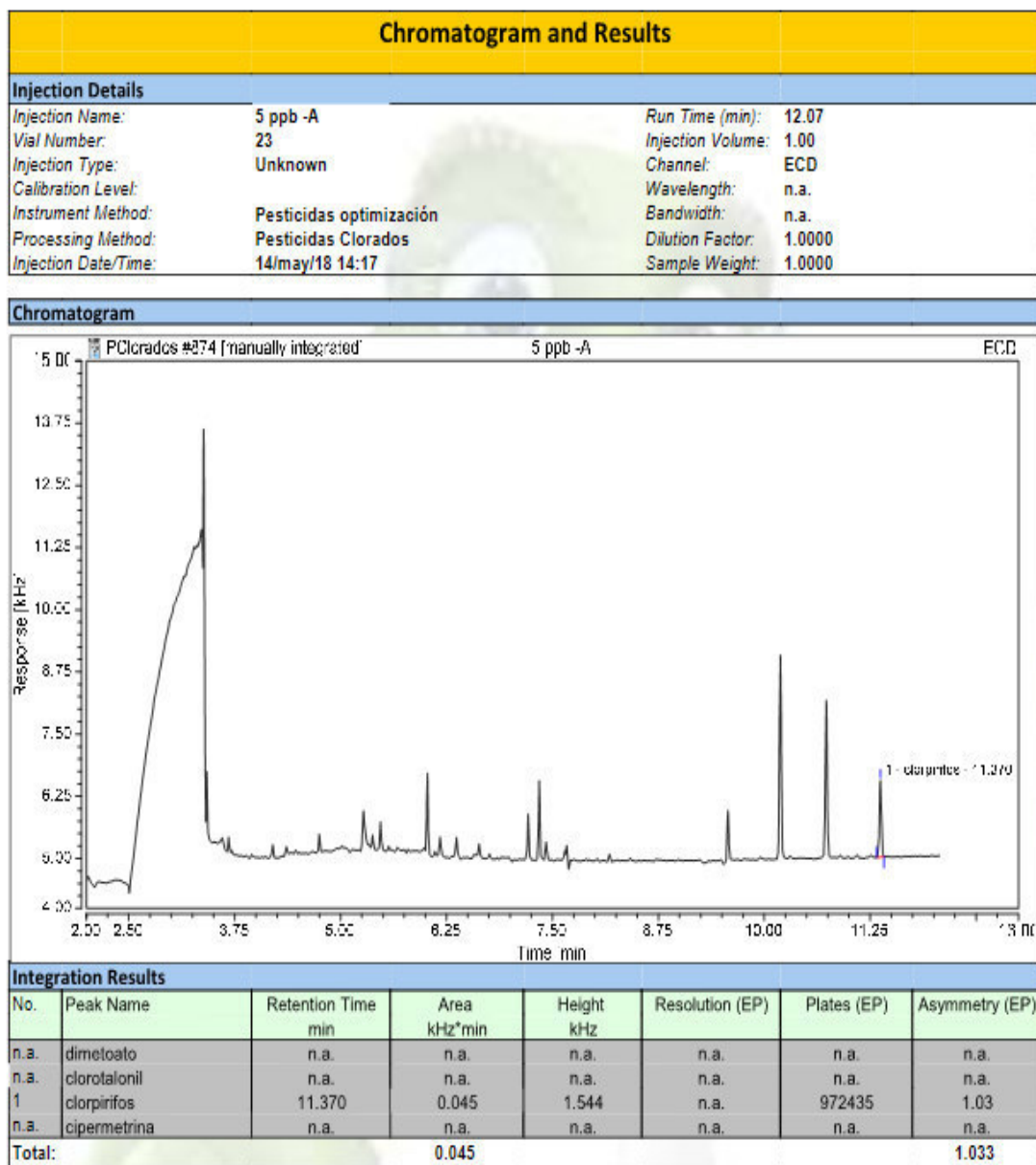
Anexo 5. Cromatograma de blanco fortificado con estándar de plaguicida clorpirifos 50 ppb



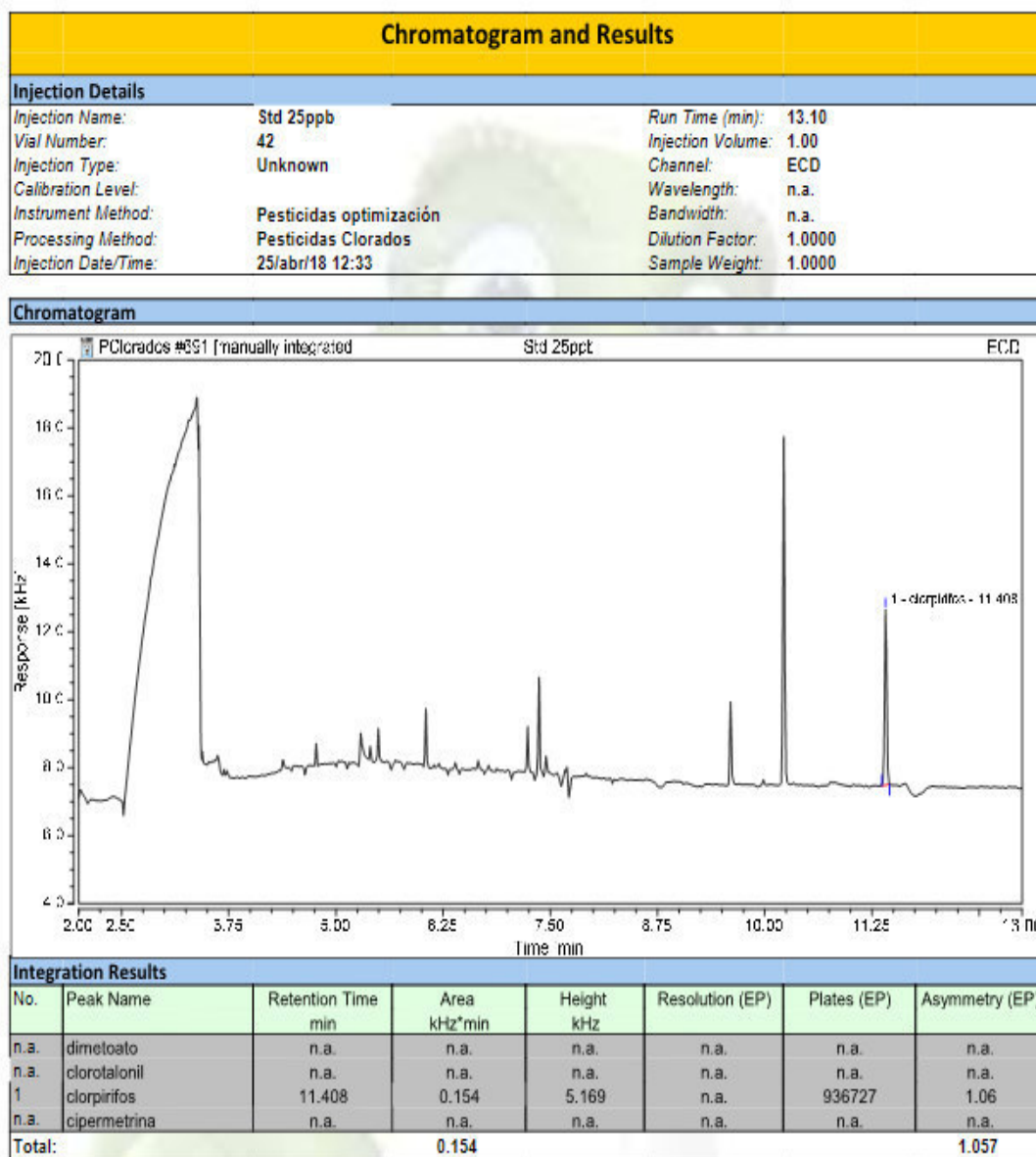
Anexo 6. Cromatograma de blanco fortificado con estándar de plaguicida clorpirifos 100 ppb.



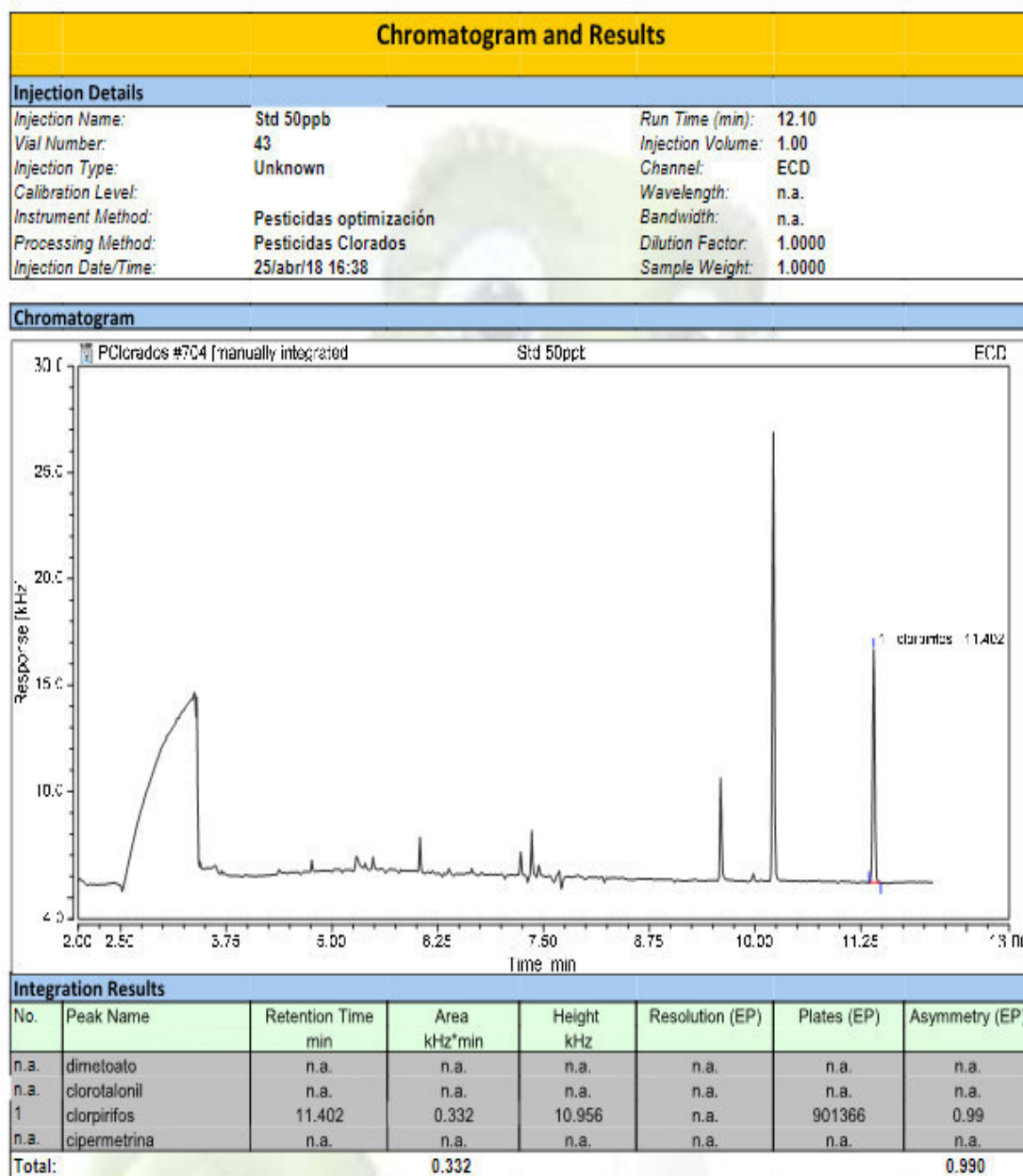
Anexo 7. Cromatograma plaguicida clorpirifos a la concentración de 5 ppb



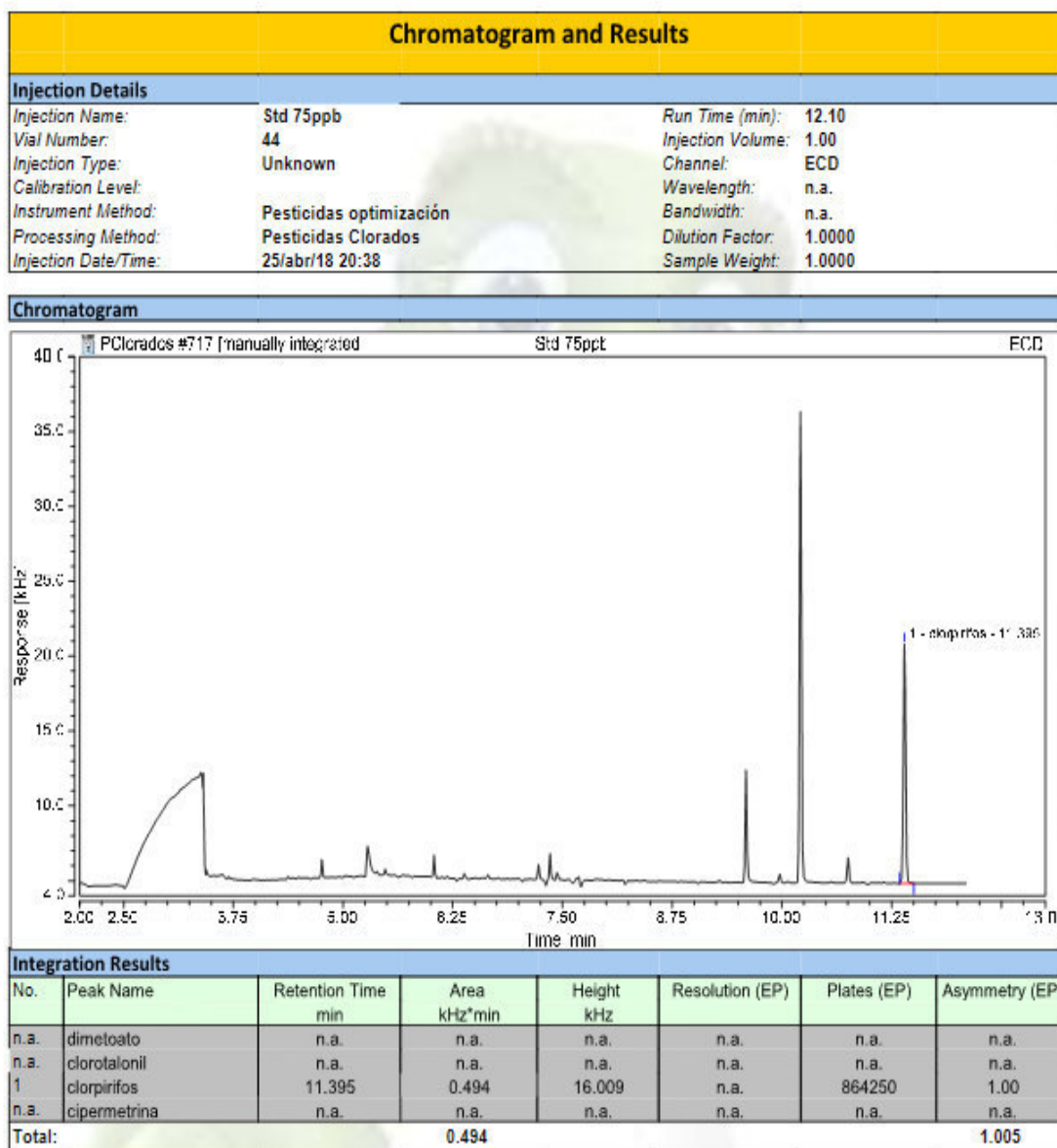
Anexo 8. Cromatograma plaguicida clorpirifos a la concentración de 25 ppb



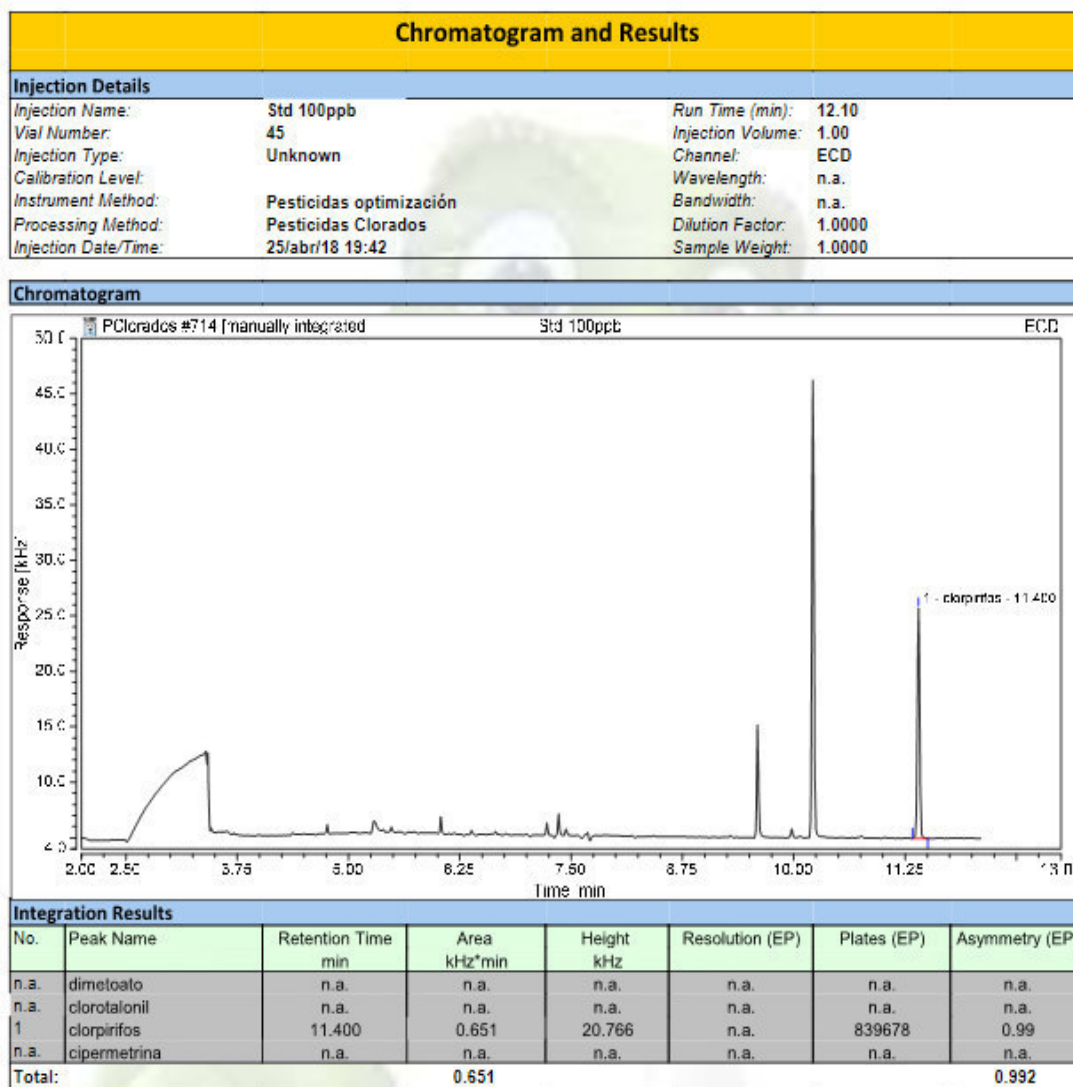
Anexo 9. Cromatograma plaguicida clorpirifos a la concentración de 50 ppb



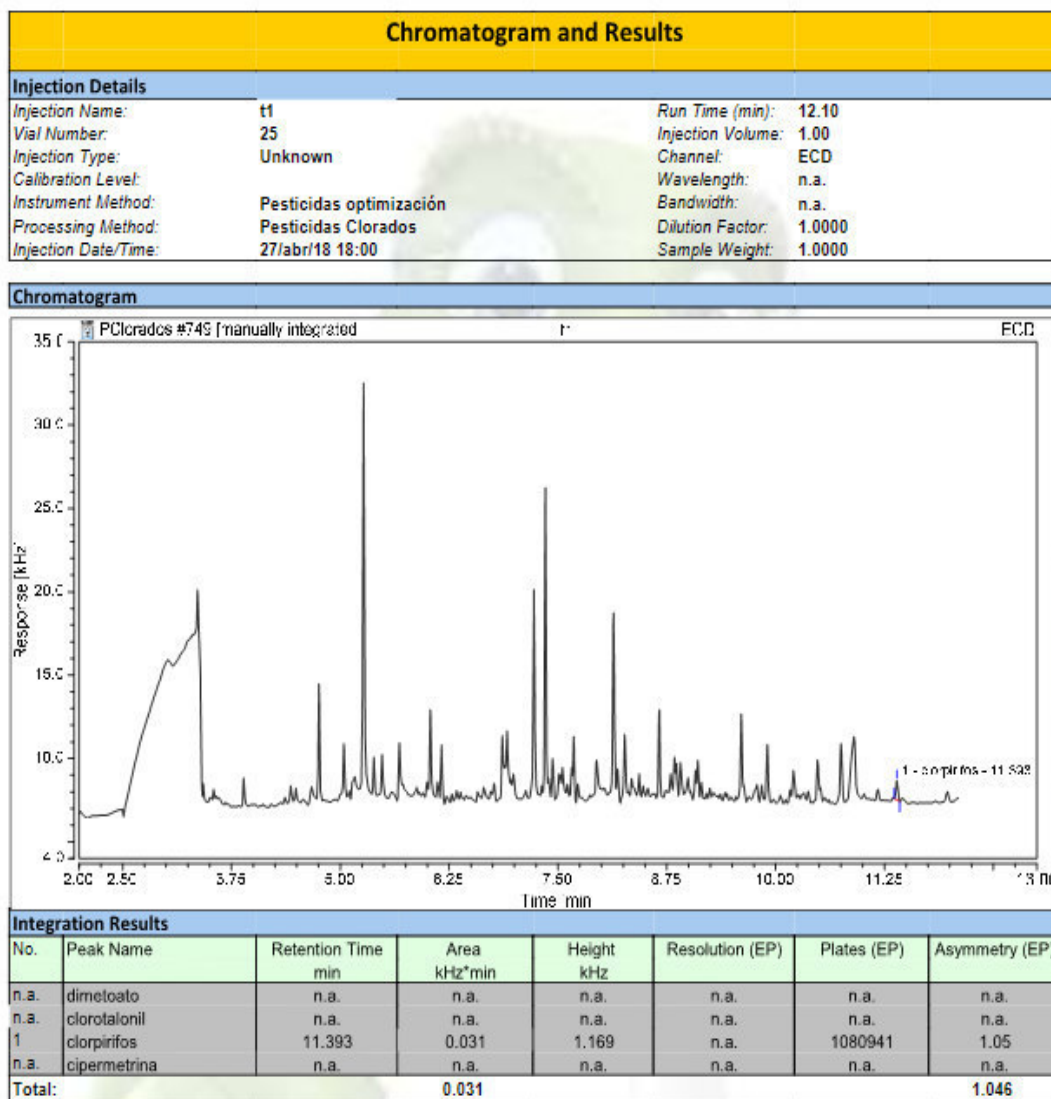
Anexo 10. Cromatograma plaguicida clorpirifos a la concentración de 75 ppb



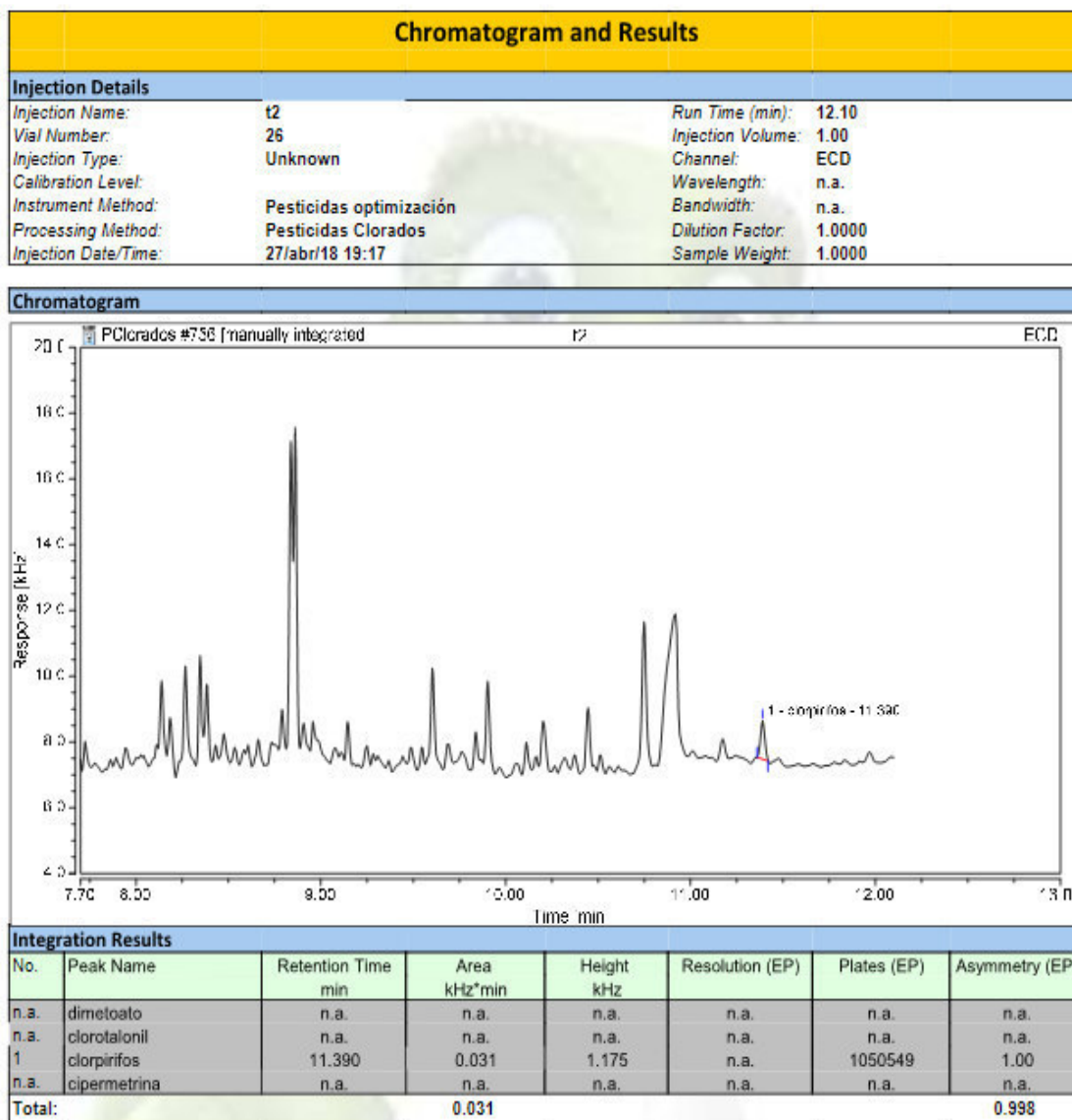
Anexo 11. Cromatograma plaguicida clorpirifos a la concentración de 100 ppb.



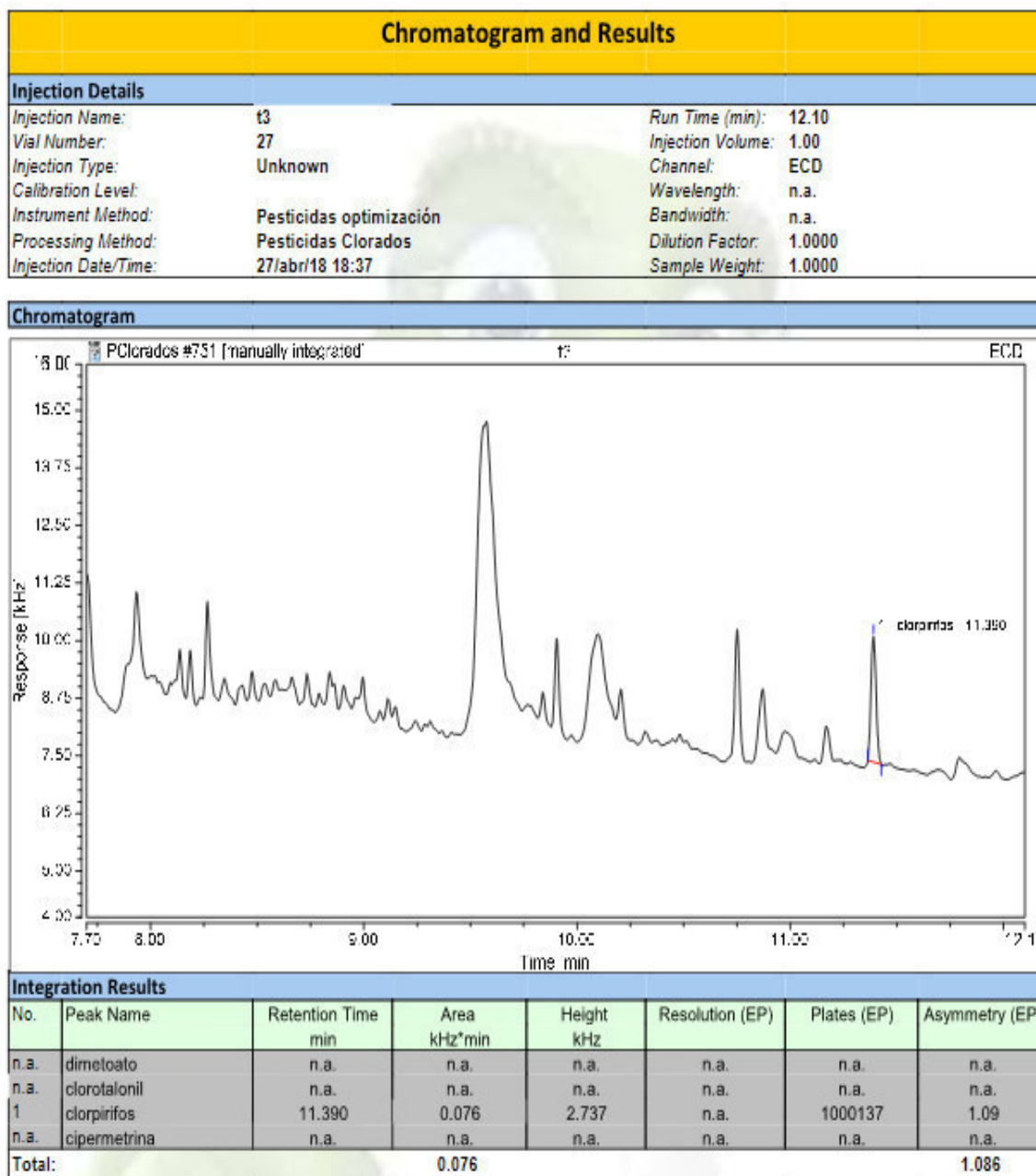
Anexo 12. Cromatograma de la muestra M1



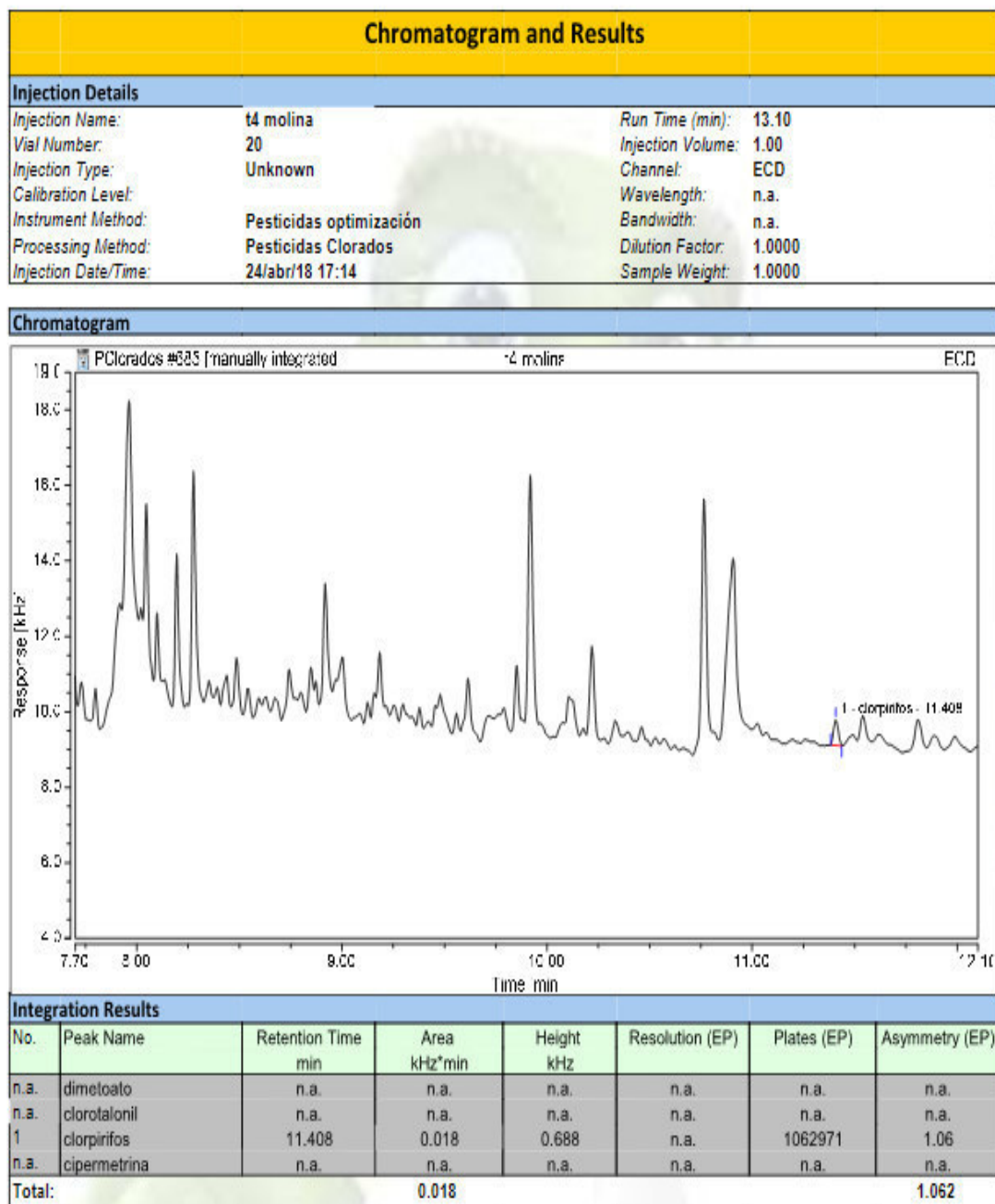
Anexo 13. Cromatograma de la muestra M2



Anexo 14. Cromatograma de la muestra M3



Anexo 15. Cromatograma de la muestra M4



Anexo 16. Certificado de producción orgánica en el distrito de Omas

CERTIFICADO
ORGÁNICO
PARA EL PERÚ



Emitido a "Asociación de Promotores Agrícolas de Mala y Omas
Dos Valles – Instituto Huayuna"
Mza. E Lote 28 Urb. San Martín (Costado del Mercado)
Lima - Cañete – Mala
PERÚ

Número del certificado PER-HUAYUNA-0071/05.16/0453

Este certificado de cumplimiento comprueba que la entidad inspeccionada se encuentra en conformidad con el Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos en el Perú, según el Decreto Supremo N° 044-2006-AG en los campos de:

- Producción Agrícola

VER ANEXO CON PRODUCTOS CERTIFICADOS

Kiwa BCS ÖKO GARANTIE PERÚ S.A.C. es una certificadora orgánica Peruana, con registro vigente ante SENASA como organismo Certificador de productos orgánicos de acuerdo al requerimiento establecido en la ley # 29196, D.S. N° 061-2006-AG

El presente certificado no es una garantía de calidad de productos, solamente confirma el cumplimiento con el Reglamento Técnico Peruano para los Productos Orgánicos. No representa un certificado de comercialización, y es válido solamente como original. Las copias deberán estar marcadas como tales.

Este Certificado tiene una vigencia de 12 meses a partir de la decisión de certificación, pero su renovación deberá darse antes de que se cumpla 12 meses desde la fecha de Inspección. El Certificado está vigente hasta nuevo aviso, siempre que el operador continúe cumpliendo las condiciones establecidas en el contrato del cliente con Kiwa BCS Öko Garantie Perú S.A.C.

Fecha de Inspección: 12.05.2016
Certificado válido hasta: 18.08.2017

Lima, 19 de agosto del 2016


José Manuel Correa Lertundi
Gerente General



Kiwa BCS Öko Garantie Perú S.A.C.

Dirección: Plaza 27 de Noviembre 430 Of. 28 San Isidro, Lima - Perú • Telefax: 0051 (1) 221 5633
email: info@kbc-peru.com • Web: www.kbc-peru.com / www.eko-garantie-peru.com

Anexo 17. Cálculo de platos teóricos.

La fórmula para calcular platos teóricos

$$N = 16(t_R/W)^2$$

Donde:

N: número de platos teóricos (adimensional)

Tr: Tiempo de retención (min)

W: ancho de pico en base (min)

Dado los datos obtenidos, del equipo de GC.

Tiempo retención: 11.395 min

Anchura de pico: 0.049 min

Se calcula el número de platos teóricos

$$N = 16(11.395/0.049)^2$$

$$N = 864250$$

Anexo 18. Información de PromPerú sobre LMR de plaguicidas en alimentos

<http://plaguicidaslmr.promperu.gob.pe/>

 [Búsqueda](#) [Condiciones de uso](#) [Plaguicidas](#) [Glosario de términos](#) [Contacto](#)

Plaguicidas LMR _____ ...

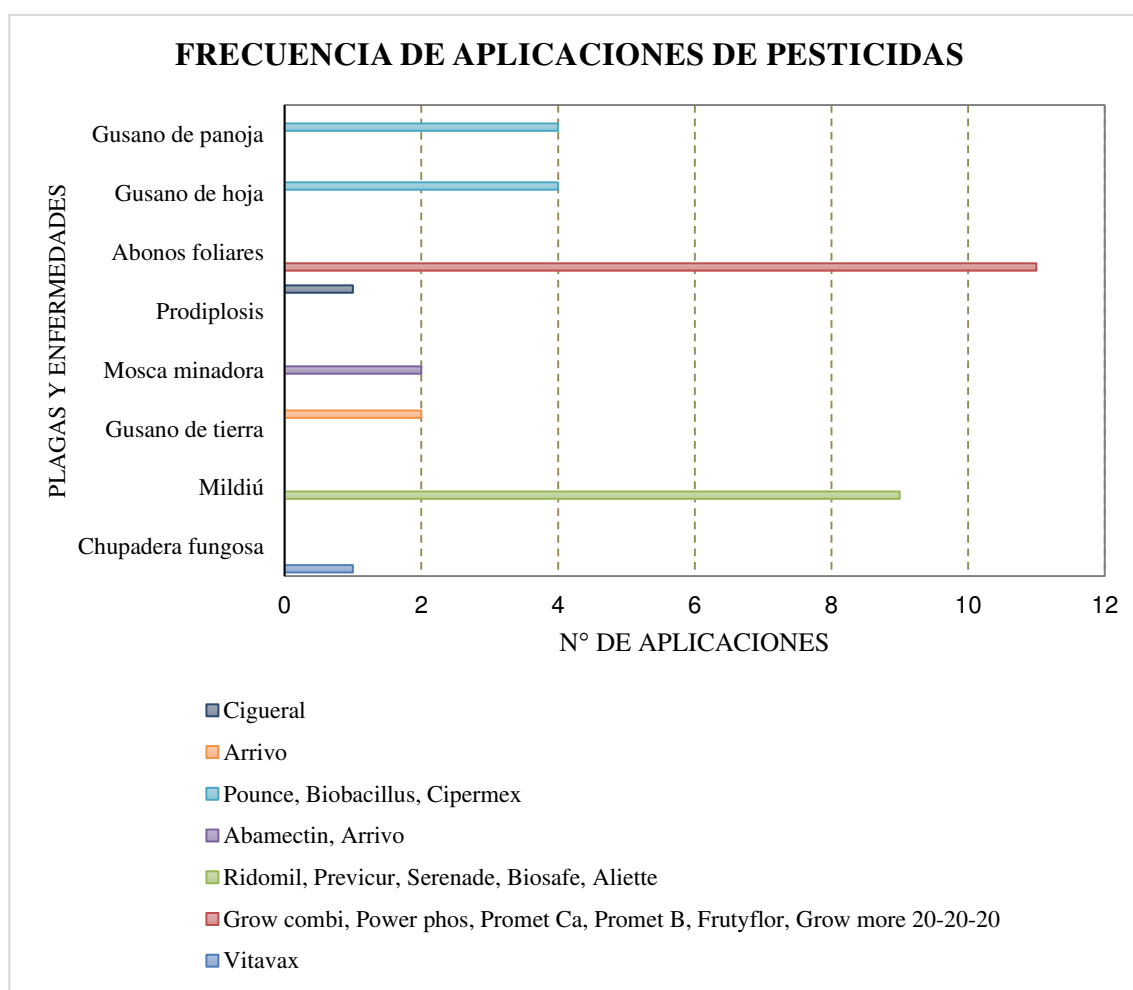
Brinda información sobre los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas establecidos por cultivo en los principales países a los que exportamos.

Fuentes de Información

Derechos de imagen: Todas las imágenes fueron extraídas de Shutterstock

Anexo 19. Lista de plaguicidas utilizados en la producción de quinua

Plaguicidas	Plaga a controlar
Bipiridilos (paraquat) y Organofosforados (glifosato)	Malezas
Piretroides (deltametrina, cipermetria)	Polilla , mosca minadora
Piretroides, organofosforados (metamidofos, clorpirifos)	gusano defoliador, gusano de tierra
organoclorados (clorotalonil), carbamatos (mancozeb)	Mildiú
organoclorados (clorotalonil), carbamatos (mancozeb)	Chupadera fungosa



Anexo 20. Certificado de análisis del plaguicida clorpirifos en solución

SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com Outside USA: eutechnserv@sigmaaldrich.com

Certificate of Analysis

Product Name: CHLORPYRIFOS SOLUTION
100µg/mL in acetonitrile, PESTANAL™, analytical standard

Product Number: 31553

Batch Number: BCBS8837V

Brand: Sigma-Aldrich

CAS Number: 2921-88-2

Formula: C₈H₁₁ClN₂O₃PS


Formula Weight: 350.59

Storage Temperature: 2-8 °C

Expiration Date: DEC 2021

Quality Release Date: 27 JAN 2017

TEST	SPECIFICATION	RESULT
CONCENTRATION COMP1	~ 100 UG/ML	100.70 UG/ML
SOLVENT	ACETONITRILE	ACETONITRILE
PURITY (GC AREA %)	≥ 98.0%	99.3%
REFRACTIVE INDEX N20/D	1.3419 - 1.3459	1.3439
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS


Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Sigma-Aldrich Certificate of Analysis - Product 31553 Lot BCBS8837V Page 1 of 2

Anexo 21. Certificado de análisis de los cartuchos C18

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE™

Certificate of Analysis

Single Use Only

Sep-Pak®
Waters
Made in France

Sep-Pak® Vac 3cc (500mg)
C18 Cartridges

Waters
MADE IN FRANCE

Qty/Box: 50
Part No.: WAT020605
Lot No.: 042237263A

Product Test Results

	Result		Result
Average Sorbent Weight	Pass	Average Air Flow Rate	Pass

Production Approved: Rae Tobbs Date: 02 Oct 17
Manufacturing

Sep-Pak® C18 Sorbent Batch # 422

Sorbent Test Results

	Result
Surface Area (m ² /g)	323
Total Carbon (%)	11.99
Moisture (%)	0.4
Particle Size - 50% Volume (µm)	77.2
Particle Size - 90%/10% Volume Ratio	1.58

Sorbent Selectivity Test - Chromatography

Relative Retention	Result
Propylparaben / Acenaphthene	Pass
Toluene / Acenaphthene	Pass
Propranolol / Acenaphthene	Pass
Dibutyl Phthalate / Acenaphthene	Pass
Doxepin / Acenaphthene	Pass

Quality Control Approved: Sonal Chavan Date: 01 August 2017

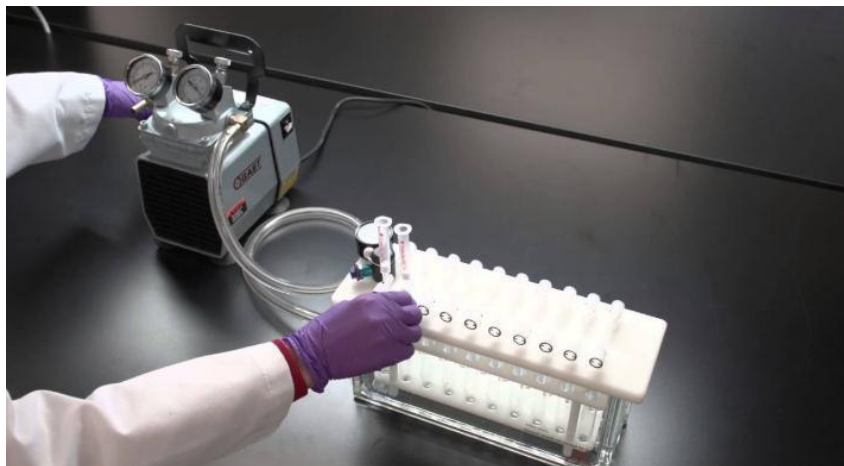
Sep-Pak and Waters are trademarks of Waters Corporation.
© Waters Corporation 2012.

WAT020605 Rev 2

Waters and The Science of What's Possible are trademarks of Waters Corporation. © 2008 Waters Corporation
Waters Corporation 34 Maple Street, Milford, Massachusetts 01757-3696 U.S.A. 508 478-2000 www.waters.com

WX WAT051157, Rev. 0
Page 1 of 1

Anexo 22. Estándar de clorpirifos, SPE y Equipo GC-ECD



Equipo Extracción SPE



Estándar plaguicida
clorpirifos de la marca



Equipo de
cromatografía
de gases –
acoplado a
un detector
de captura
electrones
(GC-ECD)